CONJUGADOS DE OLIGÓMERO CON OMISIÓN DE EXÓN PARA LA DISTROFIA MUSCULAR

SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de los Estados Unidos n.°: 62/562,146 presentada el 27 de septiembre de 2017 y la Solicitud Internacional de Patente n.° PCT/US2017/066509 presentada el 14 de diciembre de 2017. Todas las enseñanzas de las solicitudes a las que se hizo referencia anteriormente se incorporan por referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha remitido electrónicamente en formato ASCII y que queda incorporado por la presente por referencia en su totalidad. Dicha copia en ASCII, creada el 2 de marzo de 2020, se ha nombrado 814753WO01_Sequence_Listing.txt y tiene un tamaño de 3 KB.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

[0003] La presente divulgación se refiere a nuevos conjugados de oligómero antisentido adecuadas para omitir el exón 53 en el gen de distrofina humano y a las composiciones farmacéuticas de los mismos. La divulgación también proporciona métodos para inducir la omisión del exón 53 usando los nuevos conjugados de oligómero antisentido, métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53 y métodos para tratar a un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53.

ANTECEDENTES DE LA DIVULGACIÓN

[0004] Se encuentran en desarrollo tecnologías antisentido que usan una variedad de químicas para afectar a la expresión génica en una variedad de diferentes niveles

(transcripción, corte y empalme, estabilidad, traducción). Gran parte de dicha investigación se ha centrado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar respecto de genes anormales o asociados con enfermedades en una gran variedad de indicaciones. Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad y debido a esto, muchas líneas de investigación relativas a los oligómeros como moduladores de la expresión génica se han centrado en inhibir la expresión de genes diana o la función de elementos de acción en cis. Los oligómeros antisentido se dirigen normalmente contra ARN, ya sea la hebra con sentido (por ejemplo, ARNm) o la hebra menos en el caso de algunas dianas de ARN vírico. Para lograr un efecto deseado de regulación génica negativa específica, los oligómeros por lo general o bien promueven la degradación del ARNm diana, bloquean la traducción del ARNm o bloquean la función de los elementos de ARN de acción en cis, previniendo de este modo de manera efectiva la síntesis *de novo* de la proteína diana o la replicación del ARN vírico.

[0005] Sin embargo, dichas técnicas no son útiles cuando el objetivo es regular positivamente la producción de la proteína nativa o compensar respecto de mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tales como mutaciones de sentido perdido o de desplazamiento de marco. En estos casos, el transcrito génico defectuoso no ha de someterse a degradación dirigida o a inhibición estérica, por lo que la química de oligómero antisentido no debe promover la degradación del ARNm diana o bloquear su traducción.

[0006] En una variedad de enfermedades genéticas, los efectos de las mutaciones sobre la posible expresión de un gen pueden modularse a través de un proceso de omisión del exón seleccionado como diana durante el proceso de corte y

empalme. El proceso de corte y empalme está dirigido por una maquinaria multicomponente compleja que aproxima estrechamente las uniones exón-intrón adyacentes en el pre-ARNm y lleva a cabo la escisión de enlaces fosfodiéster en los extremos de los intrones con su posterior reformación entre exones que se han de cortar y empalmar juntos. Este complejo y altamente preciso proceso está mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm que son relativamente cortos, segmentos de ARNm semiconservados a los que se unen varios factores de corte y empalme nucleares que posteriormente están implicados en las reacciones de corte y empalme. Al cambiar el modo en que la maquinaria de corte y empalme lee o reconoce los motivos en el procesamiento del pre-ARNm, es posible crear moléculas de ARNm cortadas y empalmadas de manera diferencial. Recientemente se ha reconocido que la mayoría de los genes humanos se someten a corte y empalme alternativo durante la expresión génica normal, aunque no se han identificado los mecanismos implicados. Bennett *et al.* (Patente de los Estados unidos n.º 6,210,892) describen la modulación antisentido del procesamiento del ARNm celular de tipo silvestre usando análogos de oligómero antisentido que no inducen la escisión mediada por RNasa H del ARN diana. Esto resulta útil al ser capaz de generar ARNm cortados y empalmados de manera alternativa que carecen de exones específicos (véase, por ejemplo, la descripción de Sazani, Kole, et al. 2007 para la generación de receptores de la superfamilia de TNF solubles que carecen de exones que codifican dominios transmembrana).

[0007] En casos en los que una proteína normalmente funcional se termina prematuramente debido a mutaciones en la misma, un medio para restaurar algo de producción de proteína funcional a través de tecnología antisentido ha mostrado ser posible a través de intervención durante los

procesos de corte y empalme, y que si los exones asociados con mutaciones que provocan enfermedades pueden eliminarse específicamente de algunos genes, algunas veces puede producirse un producto proteico acortado que tiene propiedades biológicas similares a la proteína nativa o tiene suficiente actividad biológica como para mejorar la enfermedad provocada por mutaciones asociadas con el exón (véanse, 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). Kole *et al*. (Patentes de los Estados Unidos n.°: 5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; y 5,665,593) divulgan métodos para combatir el corte y empalme aberrante usando análogos de oligómero antisentido modificados que no promueven la degradación del pre-ARNm diana. Bennett *et al*. (Patente de los Estados unidos n.° 6,210,892) describen la modulación antisentido del procesamiento del ARNm celular de tipo silvestre usando también análogos de oligómero antisentido que no inducen la escisión mediada por RNasa H del ARN diana.

[0008] Es probable que el proceso de omisión de exón dirigida sea particularmente útil en genes largos, en los que hay diversos exones e intrones, en los que hay redundancia en la constitución genética de los exones o en los que una proteína es capaz de funcionar sin uno o más exones particulares. Los esfuerzos para redirigir el procesamiento génico para el tratamiento de enfermedades genéticas asociadas con truncamientos provocados por mutaciones en diversos genes se ha centrado en el uso de oligómeros antisentido que o bien: (1) se solapan total o parcialmente con los elementos implicados en el proceso de corte y empalme; o (2) se unen al pre-ARNm en una posición lo suficientemente próxima al elemento para alterar la unión y la función de los factores de corte y empalme que

normalmente mediarían una reacción de corte y empalme particular que se produce en ese elemento.

[0009] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) está provocada por un defecto en la expresión de la proteína distrofina. El gen que codifica la proteína contiene 79 exones extendidos a lo largo de más de 2 millones de nucleótidos de ADN. Cualquier mutación exónica que cambie el marco de lectura del exón, o introduzca un codón de terminación, o se caracterice por la eliminación de un exón o exones fuera de marco completos, o duplicaciones de uno o más exones, tiene el potenciar de alterar la producción de distrofina funcional, dando como resultado DMD.

[0010] Se ha encontrado que una forma menos grave de la distrofia muscular, la distrofia muscular de Becker (BMD), surge cuando una mutación, normalmente una eliminación de uno o más exones, da como resultado un marco de lectura correcto a lo largo de todo el transcrito de distrofina, de manera que la traducción de ARNm a 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 mutado mantiene el marco de lectura correcto del gen, el resultado es un ARNm que codifica una proteína con una eliminación interna corta que conserva parte de la actividad, dando como resultado un fenotipo de Becker.

[0011] Durante muchos años, se ha sabido que las eliminaciones de un exón o exones que no alteran el marco de lectura de una proteína distrofina pueden dar lugar a un fenotipo de BMD, mientras que una eliminación de un exón que provoca un desplazamiento del marco dará lugar a DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). En general, las mutaciones de la distrofina, incluyendo mutaciones puntuales y eliminaciones de exones que cambian el marco de lectura y por tanto interrumpen la traducción apropiada de la proteína dan como

resultado DMD. Cabe destacar que algunos pacientes con BMD y DMD tienen eliminaciones de exones que abarcan múltiples exones.

[0012] Se ha comunicado la modulación del corte y empalme del pre-ARNm de distrofina mutante con oligorribonucleótidos antisentido tanto *in vitro* como *in vivo* (véase, por ejemplo, Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; 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).

[0013] Se han diseñado oligómeros antisentido específicamente para dirigirse a regiones específicas del pre-ARNm, normalmente exones para inducir la omisión de una mutación del gen de DMD, restaurando a dentro del marco estas mutaciones fuera de marco para permitir la producción de una proteína distrofina acortada internamente aunque funcional. Se sabe que estos oligómeros antisentido se dirigen completamente dentro del exón (las denominadas secuencias internas del exón) o a una unión donante de corte y empalme o aceptora de corte y empalme que cruza desde el exón hasta el interior de una porción del intrón.

[0014] El descubrimiento y desarrollo de dichos oligómeros antisentido para la DMD ha sido un área de investigación previa. Estos desarrollos incluyen aquellos de: (1) la University of Western Australia y Sarepta Therapeutics (cesionario de la presente solicitud): documentos WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Prosensa Technologies (en la actualidad BioMarin Pharmaceutical): documentos 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) Carolinas Medical Center: documento WO 2012/109296; (4) Royal Holloway: patentes y solicitudes que reivindican el beneficio de, e incluyendo, los n.° de Serie de los Estados Unidos 61/096,073 y 61/164,978; tales como los documentos US 8,084,601 y US 2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals y Matsuo: documento US 6,653,466; patentes y solicitudes que reivindican el beneficio de, e incluyendo, el documento JP 2000-125448, tales como el documento US 6,653,467; patentes y solicitudes que reivindican el beneficio de, e incluyendo, el documento JP 2000-256547, tal como el documento US 6,727,355; documento WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: documentos WO 2012/029986; WO 2013/100190; WO 2015/137409; WO 2015/194520; y (6) Association Institut de Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthena AG: documentos WO 2010/115993; WO 2013/053928.

[0015] El descubrimiento y desarrollo de oligómeros antisentido conjugados a péptidos penetrantes en células para la DMD también ha sido un área de investigación (véase la Publicación PCT n.° WO 2010/048586; Wu, B. et al., *The American Journal of Pathology*, Vol. 181 (2): 392-400, 2012; Wu, R. et al., *Nucleic Acids Research,* Vol. 35 (15): 5182-5191, 2007; Mulders, S. et al., *19th International Congress of the World Muscle Society*, Poster Presentation Berlín, octubre de 2014; Bestas, B. et al., *The Journal of Clinical Investigation,* doi: 10.1172/JCI76175, 2014; Jearawiriyapaisarn, N. et al., *Molecular Therapy,* Vol. 16(9): 1624-1629, 2008; Jearawiriyapaisarn, N. et al., *Cardiovascular Research*, Vol. 85: 444-453, 2010; Moulton, H.M. et al., *Biochemical Society Transactions,* Vol. 35 (4): 826-828, 2007; Yin, H. et al., *Molecular Therapy,* Vol. 19

(7): 1295-1303, 2011; Abes, R. et al., *J. Pept. Sci.,* Vol. 14: 455-460, 2008; Lebleu, B. et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 60: 517-529, 2008; McClorey, G. et al., *Gene Therapy*, Vol. 13: 1373-1381, 2006; Alter, J. et al., *Nature Medicine*, Vol. 12 (2): 175-177, 2006; y Youngblood, D. et al., *American Chemical Society,* Bioconjugate Chem., 2007, 18 (1), págs. 50-60).

[0016] Los péptidos penetrantes en células (CPP), por ejemplo, un resto de transporte de péptido rico en arginina, pueden ser eficaces para potenciar la penetración de, por ejemplo, un oligómero antisentido conjugado al CPP, al interior de una célula.

[0017] A pesar de estos esfuerzos, sigue habiendo necesidad de oligómeros antisentido mejorados que se dirigen al exón 53 y de composiciones farmacéuticas correspondientes que son potencialmente útiles para métodos terapéuticos para producir distrofina y tratar la DMD.

SUMARIO DE LA DIVULGACIÓN

[0018] Los conjugados de oligómero antisentido proporcionados en el presente documento incluyen un resto de oligómero antisentido conjugado a un CPP. En un aspecto, la divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido que comprenden:

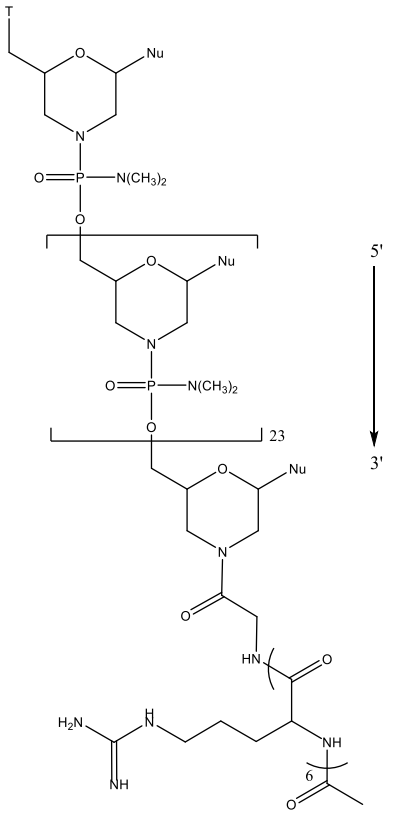
un oligómero antisentido de 25 subunidades de longitud capaz de unirse a una diana seleccionada para inducir la omisión del exón en el gen de distrofina humano, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región diana del exón 53 del pre-ARNm de distrofina designado como un sitio de hibridación; y

un péptido penetrante en células (CPP) conjugado al oligómero antisentido mediante un resto enlazador.

[0019] En algunas realizaciones, el sitio de hibridación es H53A(+36+60).

[0020] En algunas realizaciones, las bases del oligómero antisentido están unidas a estructuras de anillo de morfolino, en donde las estructuras de anillo de morfolino están unidas mediante enlaces entre subunidades 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 ciertas realizaciones, el péptido penetrante en células es de seis unidades de arginina ("R_6") y el resto enlazador es una glicina. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases designada como SEQ ID NO: 1.

[0021] En diversos aspectos, la divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido que pueden ser de acuerdo con la fórmula (I):

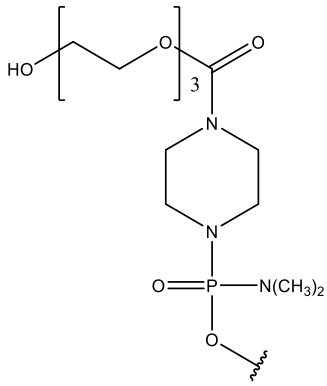


(I)

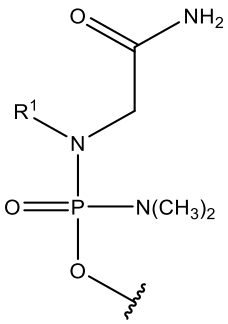
o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde:

cada Nu es una nucleobase que, tomada en conjunto, forma una secuencia de direccionamiento; y

T es un resto seleccionado entre:



;



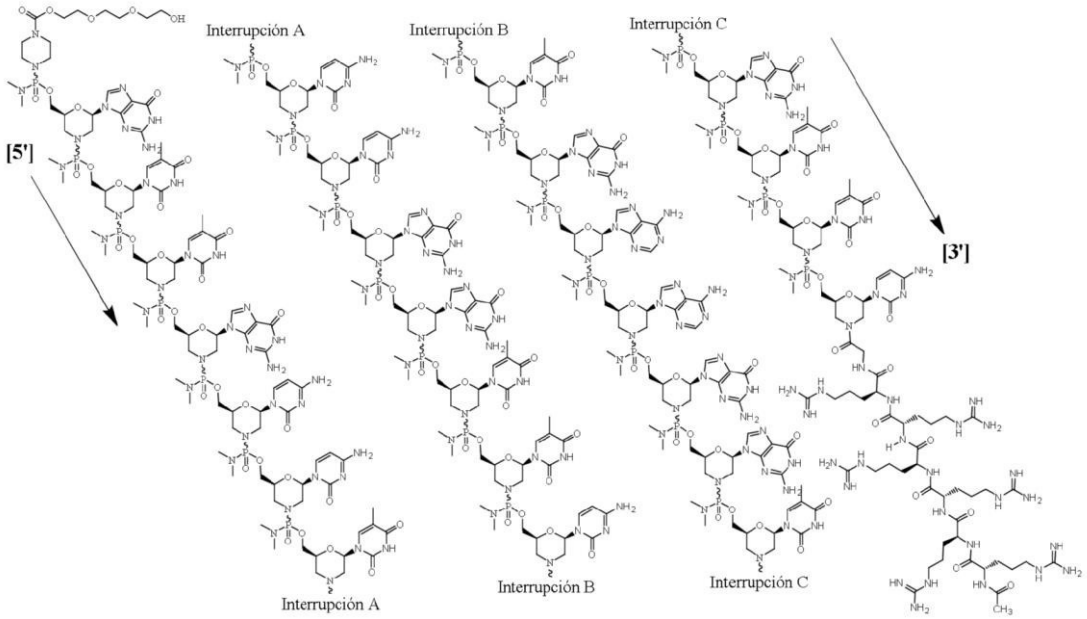
; y

;

R^1 es alquilo C_1-C_6;

en donde la secuencia de direccionamiento es complementaria a un sitio de hibridación con el exón 53 en el pre-ARNm de distrofina designado como H53A(+36+60).

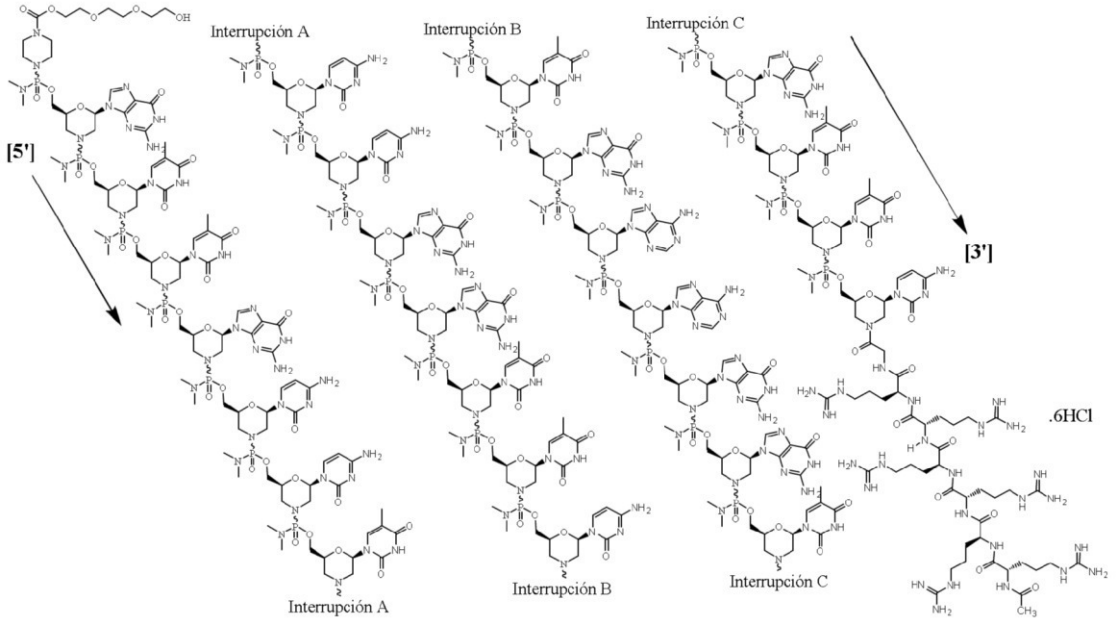
[0022] En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido de fórmula (IV):



(IV)

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

[0023] En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido de fórmula (IVA):



(IVA).

[0024] En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el portador farmacéuticamente aceptable es una solución salina que incluye un tampón fosfato.

[0025] En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación. La divulgación también aborda el uso de conjugados de oligómero antisentido de la divulgación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto que lo necesite, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53.

[0026] En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para restaurar un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para excluir el exón 53 del pre-ARNm de distrofina durante el procesamiento del ARNm en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de unión al exón 53 del pre-ARNm de distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación.

[0027] En otro aspecto, la divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación del presente documento para su uso en terapia. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

[0028] En otro aspecto, la divulgación además proporciona kits para tratar la distrofia muscular de

Duchenne (DMD) en un sujeto que lo necesite, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo dichos kits al menos un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación, envasado en un recipiente adecuado e instrucciones para su uso.

[0029] Estos y otros objetos y características se entenderán más completamente cuando se lea la siguiente descripción detallada de la divulgación en conjunción con las figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0030] La **figura 1** representa una sección de pre-ARNm y ARNm maduro de distrofina normal.

[0031] La **figura 2** representa una sección de pre-ARNm de distrofina anormal (ejemplo de DMD) y la distrofina inestable no funcional resultante.

[0032] La **figura 3** representa la restauración de la lectura "en fase" del pre-ARNm con eteplirsen, diseñado para omitir el exón 51.

[0033] La **figura 4** proporciona un diagrama de barras del porcentaje de omisión del exón 53 en mioblastos humanos sanos mediante PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 a diversas concentraciones 96 horas después del tratamiento, medido mediante RT-PCR. Las barras de error representan la media ± DT.

[0034] Las **figuras 5A-5D** proporcionan imágenes representativas de análisis de transferencia de Western que miden la proteína distrofina en el cuádriceps de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes puntos de tiempo [7 días (5A), 30 días (5B), 60 días (5C) y 90 días (5D)].

[0035] La **figura 6A** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre

inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el cuádriceps de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante análisis de transferencia de Western.

[0036] La **figura 6B** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de omisión del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el cuádriceps de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante RT-PCR.

[0037] Las **figuras 7A-7D** proporcionan imágenes representativas de análisis de transferencia de Western que miden la proteína distrofina en el diafragma de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes puntos de tiempo [7 días (7A), 30 días (7B), 60 días (7C) y 90 días (7D)].

[0038] La **figura 8A** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante análisis de transferencia de Western.

[0039] La **figura 8B** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de omisión del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante RT-PCR.

[0040] Las **figuras 9A-9D** proporcionan imágenes representativas de análisis de transferencia de Western que miden la proteína distrofina en el corazón de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes puntos de tiempo [7 días (9A), 30 días (9B), 60 días (9C) y 90 días (9D)].

[0041] La **figura 10A** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón

de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante análisis de transferencia de Western.

[0042] La **figura 10B** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de omisión del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante RT-PCR.

[0043] La **figura 11** proporciona un análisis de inmunohistoquímica que muestra distrofina en el cuádriceps izquierdo de ratones mdx inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225).

[0044] Las **figuras 12A-B** proporcionan imágenes representativas de análisis de transferencia de Western que miden la proteína distrofina en el corazón de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.

[0045] La **figura 13** proporciona un diagrama de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida mediante PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de ratones mdx, determinado mediante análisis de transferencia de Western 30 días después de la inyección a diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.

[0046] Las **figuras 14A-B** proporcionan imágenes representativas de análisis de transferencia de Western que miden la proteína distrofina en el diafragma de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.

[0047] La **figura 15** proporciona un diagrama de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida mediante PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx, determinado mediante análisis de transferencia de Western 30 días después de la inyección a diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.

[0048] Las **figuras 16A-B** proporcionan imágenes representativas de análisis de transferencia de Western que miden la proteína distrofina en el cuádriceps de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.

[0049] La **figura 17** proporciona un diagrama de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida mediante PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el cuádriceps de ratones mdx, determinado mediante análisis de transferencia de Western 30 días después de la inyección a diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.

[0050] La **figura 18** muestra los ciclos de acoplamiento llevados a cabo mediante el método de síntesis B de PMO.

[0051] La **figura 19** proporciona un análisis de inmunohistoquímica que muestra la distrofina y laminina en diafragma y corazón de ratón mdx inducida por PPMO (PPMO4225) en comparación con suero salino en ratones mdx y ratones de tipo silvestre.

[0052] La **figura 20** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo del cuádriceps, determinado mediante RT-PCR.

[0053] La **figura 21** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo del diafragma, determinado mediante RT-PCR.

[0054] La **figura 22** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente

durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo del corazón, determinado mediante RT-PCR.

[0055] La **figura 23** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo del bíceps, determinado mediante RT-PCR.

[0056] La **figura 24** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo del deltoides, determinado mediante RT-PCR.

[0057] La **figura 25** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo de la aorta, determinado mediante RT-PCR.

[0058] La **figura 26** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo del duodeno, determinado mediante RT-PCR.

[0059] La **figura 27** proporciona una gráfica de líneas que muestra el porcentaje de omisión del exón 53 en primates no humanos tratados con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 semanalmente durante cuatro semanas a varias dosis. Se midió el porcentaje de omisión del exón 53 de muestras de músculo del colon, determinado mediante RT-PCR.

[0060] La **figura 28** proporciona un diagrama de barras del porcentaje de omisión del exón 53 en miotubos humanos sanos mediante PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 a diversas concentraciones 96 horas después del tratamiento, medido mediante RT-PCR. Las barras de error representan la media ± DT.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

[0061] Las realizaciones de la presente divulgación se refieren, en general, a conjugados de oligómero antisentido mejorados y a métodos de uso de los mismos, que están específicamente diseñados para inducir la omisión de exones en el gen de distrofina humano. La distrofina desempeña un papel vital en la función muscular, y diversas enfermedades relacionadas con los músculos se caracterizan por formas mutadas de este gen. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido mejorados descritos en el presente documento inducen la omisión de exones en formas mutadas del gen de distrofina humano, tales como los genes de distrofina mutados encontrados en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD).

[0062] Debido a los eventos de corte y empalme de ARNm aberrantes provocados por mutaciones, estos genes de distrofina humanos mutados o bien expresan la proteína distrofina defectuosa o no expresan en absoluto cantidades medibles de distrofina, una afección que ocasiona varias formas de distrofia muscular. Para remediar esta afección, los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación hibridan con regiones seleccionadas de un ARNm pre-procesado de un gen de distrofina humano mutado, inducen la omisión de exones y el corte y empalme diferencial en dicho ARNm de distrofina cortado y empalmado de manera por lo demás aberrante y de este modo, permiten a las células

musculares producir un transcrito de ARNm que codifica una proteína distrofina funcional. En ciertas realizaciones, la proteína distrofina resultante no es necesariamente la forma de "tipo silvestre" de distrofina, sino que es una forma truncada, aunque funcional, de distrofina.

[0063] Al aumentar los niveles de proteína distrofina funcional en células musculares, estas realizaciones y otras relacionadas son útiles en la profilaxis y el tratamiento de la distrofia muscular, especialmente aquellas formas de distrofia muscular, tales como DMD y BMD, que se caracterizan por la expresión de proteínas distrofina defectuosas debido al corte y empalme aberrante de ARNm. Los conjugados de oligómero antisentido específicos descritos en el presente documento proporcionan además direccionamiento específico a exones de distrofina mejorado frente a otros oligómeros y de este modo, ofrecen ventajas significativas y prácticas frente a métodos alternativos para tratar formas relevantes de distrofia muscular.

[0064] Por lo tanto, la divulgación se refiere a conjugados de oligómero antisentido que comprenden:

un oligómero antisentido de 25 subunidades de longitud capaz de unirse a una diana seleccionada para inducir la omisión del exón en el gen de distrofina humano, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región diana del exón 53 del pre-ARNm de distrofina designado como un sitio de hibridación; y

un péptido penetrante en células (CPP) conjugado al oligómero antisentido mediante un resto enlazador.

[0065] En algunas realizaciones, el sitio de hibridación es H53A(+36+60).

[0066] En algunas realizaciones, las bases del oligómero antisentido están unidas a estructuras de anillo

de morfolino, en donde las estructuras de anillo de morfolino están unidas mediante enlaces entre subunidades 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 ciertas realizaciones, el péptido penetrante en células es R_6 y el resto enlazador es una glicina. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido comprende la secuencia de bases designada como SEQ ID NO: 1, en donde cada base de timina (T) es opcionalmente una base de uracilo (U).

[0067] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por los expertos habituales en la materia a la que pertenece la divulgación. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o el ensayo de la presente divulgación, se describen métodos y materiales preferidos. A efectos de la presente divulgación, se definen a continuación los siguientes términos.

I. Definiciones

[0068] Por "aproximadamente" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% respecto de una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, peso o longitud de referencia.

[0069] El término "alquilo", como se usa en el presente documento, a menos que se especifique otra cosa, se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado saturado. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo es un hidrocarburo primario, secundario o terciario. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo incluye de uno a diez átomos de carbono, es decir,

alquilo de C_1 a C_{10}. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo incluye de uno a seis átomos de carbono, es decir, alquilo de C_1 a C_6. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo se selecciona entre el grupo que consiste en metilo, CF_3, CCl_3, $CFCl_2$, CF_2Cl, etilo, CH_2CF_3, CF_2CF_3, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo. El término incluye grupos alquilo tanto sustituidos como no sustituidos, incluyendo grupos alquilo halogenados. En ciertas realizaciones, el grupo alquilo es un grupo alquilo fluorado. Los ejemplos no limitantes de restos con los que puede sustituirse el grupo alquilo se seleccionan entre el grupo que consiste en halógeno (fluoro, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, ya estén sin proteger o protegidos según sea necesario, como es sabido por los expertos en la materia, por ejemplo, como se enseña en Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991, por la presente incorporado por referencia.

[0070] "Susceptible a la omisión del exón 53", como se usa en el presente documento con respecto a un sujeto o paciente, pretende incluir sujetos y pacientes que tienen una o más mutaciones en el gen de distrofina que, en ausencia de la omisión del exón 53 del pre-ARNm de distrofina, provoca que el marco de lectura se encuentre fuera de marco, alterando de este modo la traducción del pre-ARNm, lo que provoca que el sujeto o paciente sea incapaz de producir distrofina funcional o semifuncional. Los ejemplos de mutaciones en el gen de distrofina que son susceptibles a la omisión del exón 53 incluyen, por ejemplo, la eliminación de: los exones 42 a 52, los exones 45 a 52, los exones 47

a 52, los exones 48 a 52, los exones 49 a 52, los exones 50 a 52 o el exón 52. La determinación de si un paciente tiene una mutación en el gen de distrofina que es susceptible a omisión de un exón se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la materia (véase, por ejemplo, Aartsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30:293-299; Gurvich et al., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640; y Fletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223.).

[0071] El término "oligómero", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de subunidades conectadas mediante enlaces entre subunidades. En ciertos casos, el término "oligómero" se usa en referencia a un "oligómero antisentido". Para los "oligómeros antisentido", cada subunidad consiste en: (i) un azúcar de ribosa o un derivado del mismo; y (ii) una nucleobase unida a la misma, de tal forma que el orden de los restos de emparejamiento de bases forma una secuencia de bases que es complementaria a una secuencia diana en un ácido nucleico (normalmente un ARN) mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero en la secuencia diana, a condición de que la subunidad, el enlace entre subunidades o ambos sean de origen no natural. En ciertas realizaciones, el oligómero antisentido es un PMO. En otras realizaciones, el oligómero antisentido es un 2'-O-metil fosforotioato. En otras realizaciones, el oligómero antisentido de la divulgación es un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA) o un ácido nucleico puenteado (BNA), tal como un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-etileno (ENA). En el presente documento se describen realizaciones ejemplares adicionales.

[0072] Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a dos o más oligómeros (es decir, comprendiendo cada uno una secuencia de nucleobases)

que están relacionados entre sí por las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia de nucleobases "T-G-A (5'→3')" es complementaria a la secuencia de nucleobases "A-C-T (3'→ 5')." La complementariedad puede ser "parcial", en la que menos de todas las nucleobases de una secuencia de nucleobases dada coinciden con la otra secuencia de nucleobases según las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la complementariedad entre una secuencia de nucleobases dada y la otra secuencia de nucleobases puede ser de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90% o aproximadamente el 95%. O, puede haber una complementariedad "completa" o "perfecta" (100%) entre una secuencia de nucleobases dada y la otra secuencia de nucleobases para continuar el ejemplo. El grado de complementariedad entre las secuencias de nucleobases tiene efectos significativos sobre la eficiencia y concentración de la hibridación entre las secuencias.

[0073] Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una cantidad de compuesto terapéutico, tal como un oligómero antisentido, administrada a un sujeto mamífero, ya sea como una sola dosis o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado. Para un oligómero antisentido, este efecto se provoca normalmente inhibiendo la traducción o el procesamiento de corte y empalme natural de una secuencia diana seleccionada o produciendo una cantidad clínicamente significativa de distrofina (significación estadística).

[0074] En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es de al menos 10 mg/kg o de al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido durante un periodo de

tiempo para tratar al sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es de al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para aumentar el número de fibras positivas para distrofina en un sujeto hasta al menos un 20% de la normalidad. En ciertas realizaciones, una cantidad eficaz es de 10 mg/kg o de al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para estabilizar, mantener o mejorar la distancia de marcha desde un déficit del 20%, por ejemplo, en una 6 MWT, en un paciente, en relación con un igual sano. En diversas realizaciones, una cantidad eficaz es de al menos 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de al menos 20 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg o de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es de aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg. En otro aspecto, una cantidad eficaz es de al menos aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg o de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, durante al menos 24 semanas, al menos 36 semanas o al menos 48 semanas, para de este modo aumentar el número de fibras positivas para distrofina en un sujeto hasta al menos un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90%, aproximadamente un 95% de la normalidad y estabilizar o mejorar la distancia de marcha desde un déficit del 20%, por ejemplo, en una 6 MWT, en el paciente en relación con un igual sano. En algunas realizaciones, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina hasta un 20-60% o un 30-50% de la normalidad en el paciente.

[0075] "Potenciar" o "potenciando" o "aumentar" o "aumentando" o "estimular" o "estimulando" se refiere generalmente a la capacidad de uno o más conjugados de oligómero antisentido o composiciones farmacéuticas para producir o provocar una respuesta fisiológica mayor (es decir, efectos aguas abajo) en una célula o un sujeto, en comparación con la respuesta provocada por o bien un conjugado de oligómero no antisentido o un compuesto de control. Una mayor respuesta fisiológica puede incluir expresión aumentada de una forma funcional de una proteína distrofina o actividad biológica aumentada relacionada con distrofina en el tejido muscular, entre otras respuestas evidentes a partir de la comprensión en la técnica y la descripción en el presente documento. El aumento de la función muscular puede medirse también, incluyendo aumentos o mejoras en la función muscular en aproximadamente un 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%. También puede medirse el porcentaje de fibras musculares que expresa una distrofina funcional, incluyendo expresión aumentada de distrofina en aproximadamente un 1%, 2%, 5%, 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 puede producirse alrededor de un 40% de mejora de la función muscular si el 25-30% de las fibras expresan distrofina (véase, por ejemplo, DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). Una cantidad "aumentada" o "potenciada" es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento 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 entre medias y por encima de 1), por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) la cantidad producida sin conjugado de oligómero antisentido (la ausencia de un agente) o un compuesto de control.

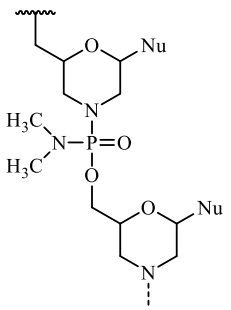
[0076] Tal como se usan en el presente documento, los términos "función" y "funcional" y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

[0077] Una proteína distrofina "funcional" se refiere en general a una proteína distrofina que tiene suficiente actividad biológica como para reducir la degradación progresiva del tejido muscular que por lo demás es característica de la distrofia muscular, normalmente en comparación con la forma alterada o "defectuosa" de proteína distrofina que está presente en determinados sujetos con DMD o BMD. En determinadas realizaciones, una proteína distrofina funcional puede tener aproximadamente un 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 la distrofina de tipo silvestre, medida según técnicas rutinarias en la técnica. Como ejemplo, la actividad relacionada con distrofina en cultivos musculares *in vitro* puede medirse según el tamaño de los miotubos, la organización (o desorganización) de las miofibrillas, la actividad contráctil y la agrupación espontánea de receptores de acetilcolina (véase, por ejemplo, Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999). Los modelos animales son también recursos valiosos para estudiar la patogenia de la enfermedad, y proporcionan un medio para someter a prueba la actividad relacionada con distrofina. Dos de los modelos animales más ampliamente usados para la investigación de DMD son el ratón mdx y el perro golden retriever con distrofia muscular (GRMD), ambos de los cuales son negativos para distrofina (véase, por

ejemplo, Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Estos y otros modelos animales pueden usarse para medir la actividad funcional de diversas proteínas distrofina. Se incluyen formas truncadas de distrofina, tales como aquellas formas que se producen después de la administración de algunos de los conjugados de oligómero antisentido que omiten exones de la presente divulgación.

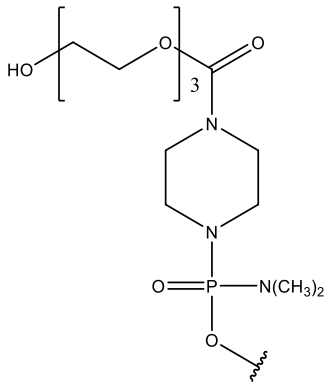
[0078] Las expresiones "emparejamiento erróneo" o "emparejamientos erróneos" se refieren a una o más nucleobases (ya sean contiguas o estén separadas) en una secuencia de nucleobases del oligómero que no se emparejan con un pre-ARNm diana de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. Aunque normalmente se desea una complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más, pero preferentemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 emparejamientos erróneos con respecto al pre-ARNm diana. Se incluyen variaciones en cualquier ubicación en el oligómero. En ciertas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación incluyen variaciones en la secuencia de nucleobases próximas a las variaciones de los extremos en el interior y en caso de estar presentes, se encuentran normalmente a aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 subunidades de los extremos 5' y/o 3'.

[0079] Los términos "morfolino", "oligómero de morfolino" y "PMO" se refieren a un oligómero de fosforodiamidato de morfolino de la siguiente estructura general:

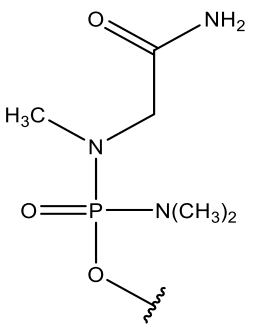


y como se describe en la figura 2 de Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Los morfolinos como se describen en el presente documento incluyen todos los estereoisómeros y tautómeros de la estructura general anterior. La síntesis, las estructuras y las características de unión de los oligómeros de morfolino se detallen en las Patentes de los Estados Unidos n.°: 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 al presente documento por referencia.

[0080] En determinadas realizaciones, un morfolino está conjugado en el extremo 5' o 3' del oligómero con un resto de "cola" para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas a modo de ejemplo incluyen:



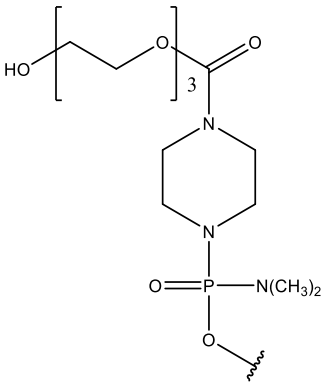
;



; y

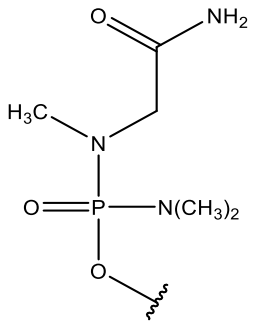
.

[0081] De los anteriores restos de cola ejemplares, "TEG" o "EG3" se refiere al siguiente resto de cola:



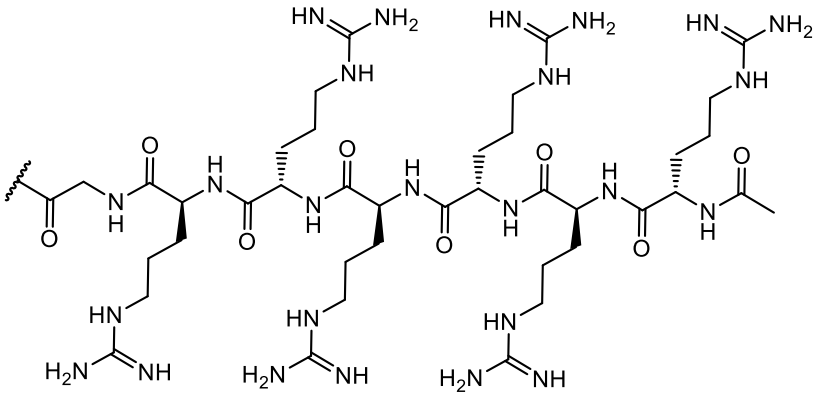
.

[0082] De los anteriores restos de cola ejemplares, "GT" se refiere al siguiente resto de cola:

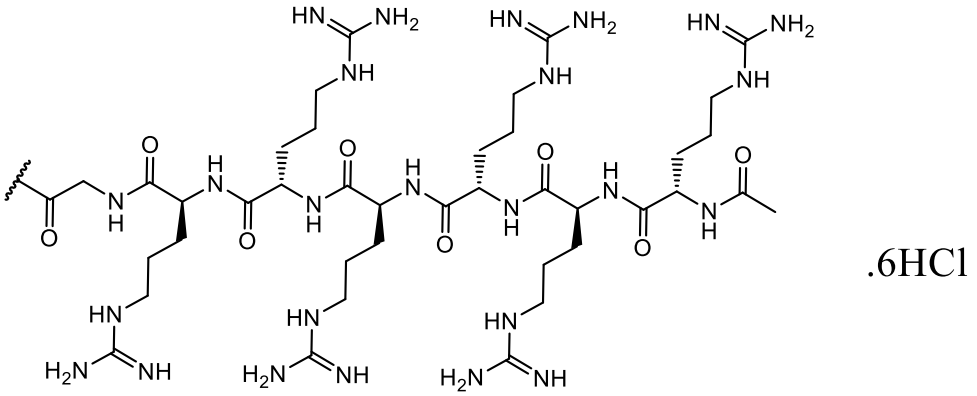


.

[0083] Como se usan en el presente documento, los términos "-G-R_6" y "-G-R_6-Ac" se usan indistintamente y se refieren a un resto peptídico conjugado a un oligómero antisentido de la divulgación. En diversas realizaciones, "G" representa un resto de glicina conjugado a "R_6" mediante un enlace amida y cada "R" representa un resto de arginina conjugado entre sí mediante enlaces amida, de tal forma que "R_6" significa seis (6) restos de arginina conjugados entre sí mediante enlaces amida. Los restos de arginina pueden tener cualquier estereoconfiguración, por ejemplo, los restos de arginina pueden ser restos de L-arginina, restos de D-arginina o una mezcla de restos de D y L-arginina. En ciertas realizaciones, "-G-R_6" o "-G-R_6-Ac" está conjugado al nitrógeno de anillo de morfolina de la subunidad de morfolino más próxima a 3' de un oligómero antisentido de PMO de la divulgación. En algunas realizaciones, "-G-R_6" o "-G-R_6-Ac" se conjuga al extremo 3' de un oligómero antisentido de la divulgación y es de la siguiente fórmula:



, o



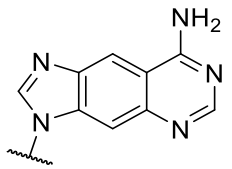
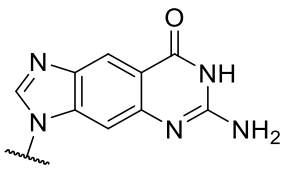
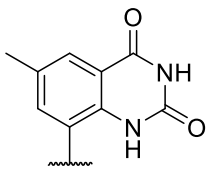
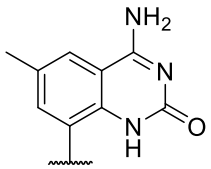
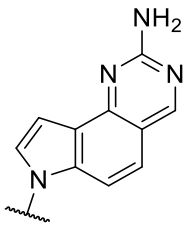
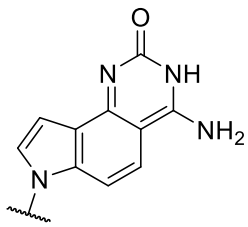
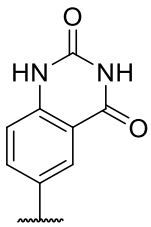
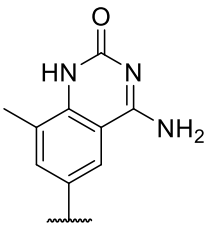
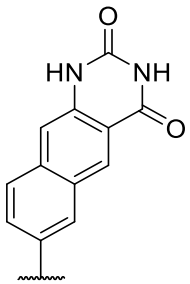
.

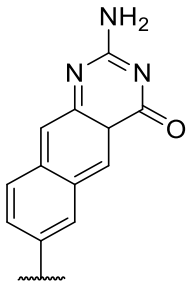
[0084] Los términos o expresiones "nucleobase" (Nu), "resto de emparejamiento de bases" o "base" se usan indistintamente para hacer referencia a una base de purina o pirimidina encontrada en el ADN o ARN de origen natural o "nativo" (por ejemplo, uracilo, timina, adenina, citosina y guanina), así como a análogos de estas purinas y pirimidinas de origen natural. Estos análogos pueden conferir propiedades mejoradas, tales como afinidad de unión, al oligómero. Los análogos ejemplares incluyen hipoxantina (el componente de base de inosina); 2,6-diaminopurina; 5-metil citosina; pirimidinas modificadas con C5-propinilo; 10-(9-(aminoetoxi)fenoxazinilo) (pinza de G) y similares.

[0085] Los ejemplos adicionales de restos de emparejamiento de bases incluyen, pero sin limitación, uracilo, timina, adenina, citosina, guanina e hipoxantina (inosina) que tienen sus grupos amino respectivos protegidos mediante grupos protectores de acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de pirimidina, tales como seudoisocitosina y seudouracilo y otras nucleobases modificadas, tales como purinas 8-sustituidas, xantina o hipoxantina (siendo estas dos últimas los productos de degradación naturales). También se contemplan las nucleobases modificadas divulgadas en: Chiu y Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048; Limbach *et al*. Nucleic Acids Research,

1994, 22, 2183-2196; y Revankar y Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313; cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia.

[0086] Los ejemplos adicionales de restos de emparejamiento de bases incluyen, pero sin limitación, nucleobases de tamaño expandido en las que se han añadido uno o más anillos de benceno. Los reemplazos de bases de ácido nucleico descritos en: el catálogo de Glen Research (www.glenresearch.com); Krueger AT *et al*., Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., *et al*., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., *et al*., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; y Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627; cuyos contenidos se incorporan al presente documento por referencia, se contemplan como útiles en los conjugados de oligómero antisentido descritos en el presente documento. Los ejemplos de nucleobases de tamaño expandido incluyen aquellas mostradas más adelante, así como formas tautoméricas de las mismas.



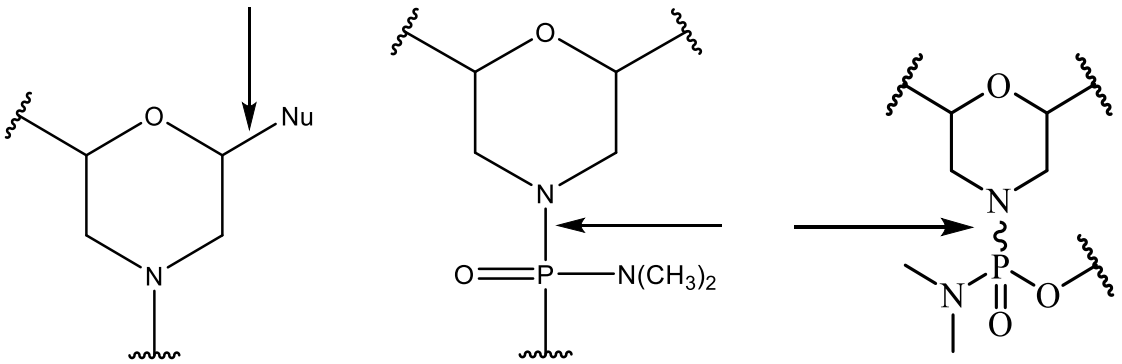
[0087] Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos de administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, infusión e inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

[0088] Para mayor claridad, las estructuras de la divulgación que incluyen, por ejemplo, la fórmula (IV), son continuas de 5' a 3' y, por comodidad de representar la estructura completa en una forma compacta, se han incluido varias interrupciones de la ilustración marcadas como "INTERRUPCIÓN A", "INTERRUPCIÓN B" e "INTERRUPCIÓN C". Tal como entendería el experto en la materia, por ejemplo, cada indicación de "INTERRUPCIÓN A" muestra una continuación de la ilustración de la estructura en estos puntos. El experto en la materia entiende que esto mismo es cierto para cada aparición de "INTERRUPCIÓN B" y para "INTERRUPCIÓN C" en las estructuras anteriores. Sin embargo, ninguna de las interrupciones en la ilustración pretende indicar, ni el experto en la técnica entendería que significaran, una discontinuación real de la estructura anterior.

[0089] Tal como se usa en el presente documento, un conjunto de corchetes usados dentro de una fórmula

estructural indican que la característica estructural entre los corchetes se repite. En algunas realizaciones, los paréntesis usados pueden ser "[" y "]", y en determinadas realizaciones, los paréntesis usados para indicar características estructurales que se repiten pueden ser "(" y ")". En algunas realizaciones, el número de iteraciones de repetición de la característica estructural entre los corchetes es el número indicado fuera de los corchetes tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, y así sucesivamente. En diversas realizaciones, el número de iteraciones de repetición de la característica estructural entre los corchetes se indica mediante una variable indicada fuera de los corchetes tal como "Z".

[0090] Como se usa en el presente documento, un enlace lineal o un enlace ondulado representado hacia un átomo de carbono o fósforo quiral en una fórmula estructural indica que la estereoquímica del carbono o fósforo quiral está indefinida y se pretende incluir todas las formas del centro quiral. A continuación se representan ejemplos de dichas ilustraciones.



[0091] La frase "farmacéuticamente aceptable" significa que la sustancia o composición debe ser compatible, química y/o toxicológicamente, con los otros componentes que comprenden una formulación, y/o el sujeto que está tratándose con la misma.

[0092] La frase "portador farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, significa una carga, diluyente, material de encapsulado o adyuvante de formulación no tóxico, sólido, semisólido o líquido inerte 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 supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua despirogenada; suero salino isotónico; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; lubricantes compatibles no tóxicos, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio; agentes colorantes; agentes de liberación; agentes de recubrimiento; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes perfumantes; conservantes; y antioxidantes; de acuerdo con el criterio del formulador.

[0093] El término "restauración", con respecto a la síntesis o la producción de distrofina, se refiere en general a la producción de una proteína distrofina, incluyendo formas truncadas de distrofina en un paciente con distrofia muscular después del tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, el tratamiento da como resultado un aumento en la producción novedosa de distrofina en un paciente en un

1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% (incluyendo todos los números enteros intermedios). En algunas realizaciones, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina hasta al menos aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 50%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 70%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un 90% o aproximadamente un 95% hasta un 100% de la normalidad en el sujeto. En otras realizaciones, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina hasta de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 60% o de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 50% de la normalidad en el sujeto. El porcentaje de fibras positivas para distrofina es un paciente tras el tratamiento puede determinarse mediante una biopsia muscular usando técnicas conocidas. Por ejemplo, puede tomarse una biopsia muscular de un músculo adecuado, tal como el músculo bíceps braquial de un paciente.

[0094] El análisis del porcentaje de fibras positivas para distrofina puede realizarse antes del tratamiento y/o después del tratamiento o en puntos de tiempo a lo largo de todo el transcurso del tratamiento. En algunas realizaciones, se toma una biopsia después del tratamiento del músculo contralateral con respecto a la biopsia antes del tratamiento. Puede llevarse a cabo el análisis de la expresión de distrofina antes y después del tratamiento usando cualquier ensayo adecuado para distrofina. En algunas realizaciones, la detección inmunohistoquímica se realiza sobre secciones tisulares a partir de la biopsia muscular usando un anticuerpo que es un marcador para distrofina, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal. Por ejemplo, puede usarse el anticuerpo MANDYS106 que es un marcador

altamente sensible para distrofina. Puede usarse cualquier anticuerpo secundario adecuado.

[0095] En algunas realizaciones, el porcentaje de fibras positivas para distrofina se calcula dividiendo el número de fibras positivas entre las fibras totales contadas. Muestras de músculo normal tienen un 100% de fibras positivas para distrofina. Por tanto, el porcentaje de fibras positivas para distrofina puede expresarse como un porcentaje de lo normal. Para controlar respecto de la presencia de niveles traza de distrofina en el músculo antes del tratamiento, así como fibras revertientes, puede establecerse un valor basal usando secciones de músculos antes del tratamiento de un paciente cuando se cuentan fibras positivas para distrofina en músculos después del tratamiento. Esto puede usarse como umbral para contar fibras positivas para distrofina en secciones de músculo después del tratamiento en ese paciente. En otras realizaciones, también pueden usarse secciones tisulares teñidas con anticuerpos para la cuantificación de distrofina usando el software de análisis de imágenes Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). La intensidad de señal de fluorescencia de distrofina total puede notificarse como un porcentaje de lo normal. Además, puede usarse análisis de inmunotransferencia de tipo Western con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-distrofina para determinar el porcentaje de fibras positivas para distrofina. Por ejemplo, puede usarse el anticuerpo anti-distrofina NCL-Dys1 de Leica Biosystems. También puede analizarse el porcentaje de fibras positivas para distrofina determinando la expresión de los componentes del complejo de sarcoglucano (β,γ) y/o NOS neuronal.

[0096] En algunas realizaciones, el tratamiento con conjugados de oligómero antisentido de la divulgación frena o reduce la disfunción muscular y/o insuficiencia

respiratoria progresiva en pacientes con DMD que se esperaría sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación puede reducir o eliminar la necesidad de respiración artificial que podría esperarse sin tratamiento. En algunas realizaciones, las mediciones de la función respiratoria para seguir el transcurso de la enfermedad, así como la evaluación de las posibles intervenciones terapéuticas, incluyen la presión inspiratoria máxima (MIP), presión espiratoria máxima (MEP) y capacidad vital forzada (FVC). 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 de los músculos respiratorios. MIP es una medida de la debilidad del músculo diafragma.

[0097] En algunas realizaciones, MEP puede disminuir antes de los cambios en otras pruebas de función pulmonar, incluyendo MIP y FVC. En determinadas realizaciones, MEP puede ser un indicador temprano de disfunción respiratoria. En determinadas realizaciones, puede usarse FVC para medir el volumen total de aire expulsado durante la exhalación forzada después de una inspiración máxima. En pacientes con DMD, FVC aumenta simultáneamente con el crecimiento físico hasta el comienzo de la adolescencia. Sin embargo, a medida que se ralentiza el crecimiento o se atrofia por la progresión de la enfermedad, y avanza la debilidad muscular, la capacidad vital entra en una fase descendente y disminuye a una tasa promedio de aproximadamente el 8 al 8.5 por ciento al año después de los 10 a 12 años de edad. En determinadas realizaciones, el porcentaje de MIP predicho (MIP ajustada al peso), el porcentaje de MEP predicho (MEP ajustada a la edad) y el porcentaje de FVC predicho (FVC ajustada a la edad y altura) son análisis de apoyo.

[0098] Los términos "sujeto" y "paciente", como se usan en el presente documento, incluyen cualquier animal que muestre un síntoma o se encuentre en riesgo de mostrar un síntoma, que pueda tratarse con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación, tal como un sujeto (o paciente) que tiene o se encuentra en riesgo de tener DMD o BMD o cualquiera de los síntomas asociados con estas afecciones (por ejemplo, pérdida de fibras musculares). Los sujetos (o pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o un perro). Se incluyen primates no humanos y preferentemente, pacientes (o sujetos) humanos. También se incluyen métodos para producir distrofina en un sujeto (o paciente) que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53.

[0099] Las frases "administración sistémica", "administrado de manera sistémica", "administración periférica" y "administrado de manera periférica" tal como se usan en el presente documento significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material de manera diferente a directamente en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del paciente y, por tanto, experimenta metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

[0100] La frase "secuencia de direccionamiento" se refiere a una secuencia de nucleobases de un oligómero que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en un pre-ARNm diana. En algunas realizaciones de la divulgación, la secuencia de nucleótidos en el pre-ARNm diana es un sitio de apareamiento del exón 53 en el pre-ARNm de distrofina designado como H53A(+36+60).

[0101] El "tratamiento" de un sujeto (por ejemplo un mamífero, tal como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención usada en un intento de alterar el transcurso natural del sujeto o la célula. El tratamiento incluye, pero no se limita a, la administración de un oligómero o una composición farmacéutica del mismo, y puede realizarse o bien profilácticamente o bien posteriormente al inicio de un acontecimiento patológico o contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o estado asociado con la proteína distrofina, como en determinadas formas de distrofia muscular, y puede incluir, por ejemplo, mejoras o cambios mínimos en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o estado que está tratándose. También se incluyen tratamientos "profilácticos", que pueden estar dirigidos a reducir la velocidad de progresión de la enfermedad o estado que está tratándose, retrasar el comienzo de la enfermedad o estado, o reducir la gravedad de su comienzo. "Tratamiento" o "profilaxis" no indica necesariamente erradicación, cura o prevención completa de la enfermedad o estado, o síntomas asociados del mismo.

[0102] En algunas realizaciones, el tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación aumenta la producción de nueva distrofina, retrasa la progresión de la enfermedad, frena o reduce la pérdida de ambulación, reduce la inflamación muscular, reduce el daño muscular, mejora la función muscular, reduce la pérdida de función pulmonar y/o potencia la regeneración muscular que podría esperarse sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene, retrasa o ralentiza la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene la deambulación o reduce la pérdida de deambulación.

En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene la función pulmonar o reduce la pérdida de función pulmonar. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de marcha estable en un paciente, tal como se mide mediante, por ejemplo, la prueba de marcha de 6 minutos (6MWT). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo hasta andar/correr 10 metros (es decir, la prueba de marcha/carrera de 10 metros). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo en ponerse en pie desde decúbito supino (es decir, prueba de tiempo en ponerse en pie). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo en ascender cuatro peldaños convencionales (es decir, la prueba de ascenso de cuatro peldaños). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce la inflamación muscular en el paciente, tal como se mide, por ejemplo, mediante MRI (por ejemplo, MRI de los músculos de las piernas). En algunas realizaciones, la MRI mide T2 y/o la fracción de grasa para identificar la degeneración muscular. La MRI puede identificar cambios en la estructura y la composición muscular provocados por inflamación, edema, daño muscular e infiltración grasa.

[0103] En algunas realizaciones, el tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación aumenta la producción de nueva distrofina y frena o reduce la pérdida de ambulación que podría esperarse sin tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede estabilizar, mantener, mejorar o aumentar la capacidad de andar (por ejemplo, estabilización de la deambulación) en el sujeto. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de marcha estable en un paciente, tal como se mide mediante, por ejemplo, la prueba de marcha de 6 minutos (6MWT), descrita por McDonald, et al. (Muscle Nerve, 2010; 42:966-74,

incorporado al presente documento por referencia). Un cambio en la distancia de marcha de 6 minutos (6MWD) puede expresarse como un valor absoluto, un porcentaje de cambio o un cambio en el % del valor predicho. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o mejora una distancia de marcha estable en una 6MWT desde un déficit del 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 puede determinarse calculando un % del valor predicho. Por ejemplo, el % de la 6MWD predicha puede calcularse usando la siguiente ecuación para hombres: 196.72 + (39.81 x edad) − (1.36 x edad^2) + (132.28 x altura en metros). Para mujeres, el % de la 6MWD predicha puede calcularse usando la siguiente ecuación: 188.61 + (51.50 x edad) − (1.86 x edad^2) + (86.10 x altura en metros) (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, versión 2, incorporado al presente documento por referencia). En algunas realizaciones, el tratamiento con un oligómero antisentido aumenta la distancia de marcha estable en el paciente desde un nivel inicial hasta más de 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, o 50 metros (incluyendo todos los números enteros intermedios).

[0104] La pérdida de función muscular en pacientes con DMD puede producirse frente a los antecedentes de desarrollo y crecimiento normales en la infancia. De hecho, los niños más jóvenes con DMD pueden mostrar un aumento en la distancia andada durante la 6MWT a lo largo del transcurso de aproximadamente 1 año a pesar de la alteración muscular progresiva. En algunas realizaciones, la 6MWD de pacientes con DMD se compara normalmente con sujetos de control normalmente en desarrollo y con datos normativos existentes de sujetos de edad y sexo coincidentes. En algunas realizaciones, el desarrollo y crecimiento normales pueden

explicarse usando una ecuación basada en la edad y la altura ajustada a los datos normativos. Puede usarse una ecuación de este tipo para convertir la 6MWD en un porcentaje del valor predicho (% predicho) en sujetos con DMD. En determinadas realizaciones, el análisis de los datos de % de 6MWD predicha representa un método para explicar el desarrollo y crecimiento normales, y puede mostrar que aumentos en la función a edades tempranas (por ejemplo, menos de o igual a una edad de 7) representan capacidades estables en vez de una mejora de las capacidades en pacientes con DMD (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, versión 2, incorporado al presente documento por referencia).

[0105] Se propuso y se publicó un sistema de nomenclatura de moléculas antisentido para distinguir entre las diferentes moléculas antisentido (véase Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Esta nomenclatura se hizo especialmente relevante cuando se sometieron a prueba varias moléculas antisentido ligeramente diferentes, todas dirigidas a la misma región diana, tal como se muestra a continuación:

H#A/D(x:y).

[0106] La primera letra designa la especie (por ejemplo, H: humano, M: murino, C: canino). "#" designa el número de exón de distrofina diana. "A/D" indica el sitio de corte y empalme aceptor o donador al comienzo y al 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 precede al exón diana y las primeras 18 bases del exón diana. El sitio de corte y empalme más cercano sería el aceptor de modo que estas coordenadas irían precedidas de una "A". La descripción de coordenadas de apareamiento en el sitio de corte y empalme

donador 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. Coordenadas de apareamiento totalmente exónicas que estarían representadas por A(+65+85), que es el sitio entre el nucleótido 65 y 85 desde el inicio de ese exón.

II. Oligómeros antisentido

A. Conjugados de oligómero antisentido diseñados para inducir la omisión del exón 53

[0107] En ciertas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación son complementarios a una región diana del exón 53 del gen de distrofina e inducen la omisión del exón 53. En particular, la divulgación se refiere a conjugados de oligómero antisentido complementarios a una región diana del exón 53 del pre-ARNm de distrofina designado como un sitio de hibridación. En algunas realizaciones, el sitio de hibridación es H53A(+36+60).

[0108] Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación se dirigen al pre-ARNm de distrofina e inducen la omisión del exón 53, de tal forma que se excluye u omite del transcrito de ARNm cortado y empalmado maduro. Al omitir el exón 53, el marco de lectura alterado se restaura a una mutación en marco. Aunque la DMD se compone de varios subtipos genéticos, los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación se diseñaron específicamente para omitir el exón 53 del pre-ARNm de distrofina. Las mutaciones de DMD susceptibles a la omisión del exón 53 comprenden un subgrupo de pacientes de DMD (8%).

[0109] La secuencia de nucleobases de un conjugado de oligómero antisentido que induce la omisión del exón 53 se diseña para que sea complementaria a una secuencia diana específica en el exón 53 del pre-ARNm de distrofina. En

algunas realizaciones, un oligómero antisentido del conjugado de oligómero antisentido es un PMO en donde cada anillo de morfolino del PMO está unido a una nucleobase que incluye, por ejemplo, nucleobases halladas en el ADN (adenina, citosina, guanina y timina).

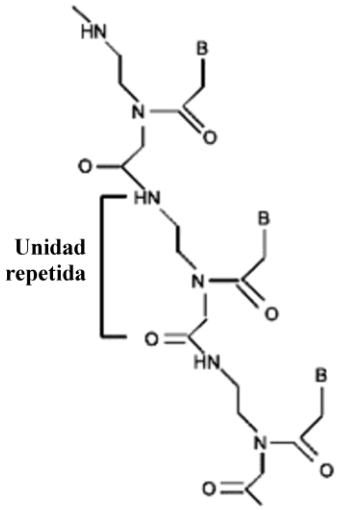
B. Características de la química del oligómero

[0110] Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación pueden emplear una variedad de químicas de oligómero antisentido. Los ejemplos de químicas del oligómero 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'-flúor, ácidos nucleicos puenteados con 2'O,4'C-etileno (ENA), triciclo-ADN, subunidades de fosforotioato de triciclo-ADN, oligómeros modificados con 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etilo], incluyendo combinaciones de cualquiera de los anteriores. Las químicas de fosforotioato y modificadas con 2'-O-Me pueden combinarse para generar una cadena principal de 2'O-Me-fosforotioato. Véanse, por ejemplo, las Publicaciones PCT n.° WO/2013/112053 y WO/2009/008725, que se incorporan al presente documento por referencia en su totalidad. Se describen a continuación con más detalle las realizaciones ejemplares de químicas de oligómero de la divulgación.

1. Ácidos nucleicos peptídicos (PNA)

[0111] Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) son análogos del ADN en los que la cadena principal es estructuralmente homomorfa con una cadena principal de desoxirribosa, que consisten en unidades de N-(2-aminoetil)glicina a las que se unen bases de pirimidina o purina. Los PNA que contienen bases de pirimidina y purina

naturales hibridan con oligómeros complementarios respetando las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick e imitan al ADN en lo referente al reconocimiento de pares de bases (Egholm, Buchardt et al. 1993). La cadena principal de los PNA se forma mediante enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster, haciendo que sean adecuados para aplicaciones antisentido (véase la estructura más adelante). La cadena principal no tiene carga, dando como resultado dúplex de PNA/ADN o PNA/ARN que muestran una estabilidad térmica mayor de lo normal. Los PNA no son reconocidos por nucleasas o proteasas. Se ilustra más adelante un ejemplo no limitante de un PNA.



PNA

[0112] A pesar de un cambio estructural radical en la estructura natural, los PNA son capaces de unirse de manera específica de secuencia en forma de hélice al ADN o ARN. Las características de los PNA incluyen una alta afinidad de unión a ADN o ARN complementario, un efecto desestabilizante causado por un solo emparejamiento de bases erróneo, resistencia a nucleasas y proteasas, hibridación con ADN o ARN independiente de la concentración de sal y formación de triplete con ADN de homopurina. PANAGENE™ ha desarrollado

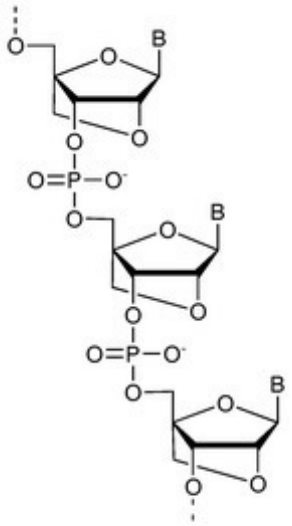
monómeros de Bts PNA patentados (Bts; grupo benzotiazol-2-sulfonilo) y procesos de oligomerización patentados. La oligomerización de PNA usando monómeros de Bts PNA está compuesta por ciclos repetitivos de desprotección, acoplamiento y remate. Los PNA pueden producirse sintéticamente usando cualquier técnica conocida en la materia. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.°: 6,969,766; 7,211,668; 7,022,851; 7,125,994; 7,145,006; y 7,179,896. Véanse también las Patentes de los Estados Unidos n.°: 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262 para la preparación de PNA. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de los compuestos de PNA en Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991. Cada uno de los anteriores se incorpora por referencia en su totalidad.

2. Ácidos nucleicos bloqueados (LNA)

[0113] Los conjugados de oligómero antisentido también pueden contener subunidades de "ácido nucleico bloqueado" (LNA). Los "LNA" son un miembro de una clase de modificaciones denominadas ácido nucleico puenteado (BNA). El BNA se caracteriza por una unión covalente que bloquea la conformación del anillo de ribosa en un fruncido del azúcar C30-endo (norte). Para el LNA, el puente está compuesto por un metileno entre las posiciones 2'-O y 4'-C. El LNA potencia la preorganización de la cadena principal y el apilamiento de bases para aumentar la hibridación y la estabilidad térmica.

[0114] Las estructuras de los LNA pueden encontrarse, por ejemplo, en Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455; Koshkin et al., Tetrahedron (1998) 54:3607; Jesper Wengel, Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; Obika, et al., Tetrahedron Letters (1998) 39:5401; y Obika, et al., Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230, que se

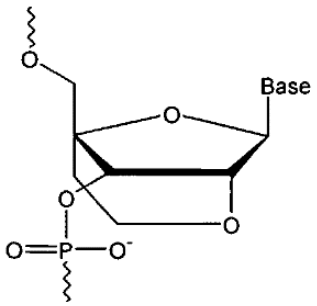
incorporan al presente documento por referencia en su totalidad. Se ilustra más adelante un ejemplo no limitante de un LNA.



LNA

[0115] Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación pueden incorporar uno o más LNA; en algunos casos, los conjugados de oligómero antisentido pueden estar compuestos completamente de LNA. Los métodos para la síntesis de subunidades de nucleósido de LNA individuales y su incorporación a oligómeros se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos: n.° 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 por referencia en su totalidad. Los enlazadores entre subunidades típicos incluyen restos de fosfodiéster y fosforotioato; como alternativa, pueden emplearse enlazadores que no contienen fósforo. Las realizaciones adicionales incluyen un conjugado de oligómero antisentido que contiene LNA, donde cada subunidad de LNA está separada por una subunidad de ADN. Ciertos conjugados de oligómero antisentido están compuestos por subunidades alternas de LNA y ADN, donde el enlazador entre subunidades es fosforotioato.

[0116] Los ácidos nucleicos puenteados con 2'O,4'C-etileno (ENA) son otro miembro de la clase de los BNA. Se ilustra más adelante un ejemplo no limitante.

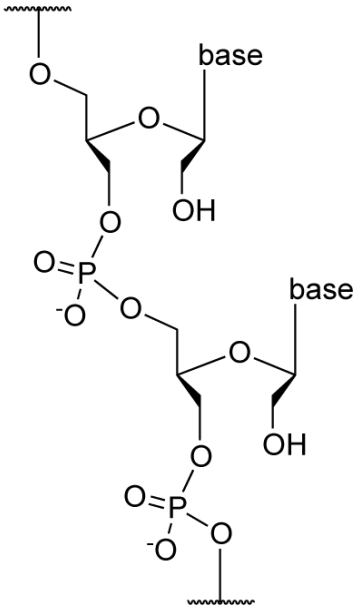


ENA

[0117] Los oligómeros de ENA y su preparación se describen en Obika et al., *Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8735, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de ENA.

3. Ácido nucleico desbloqueado (UNA)

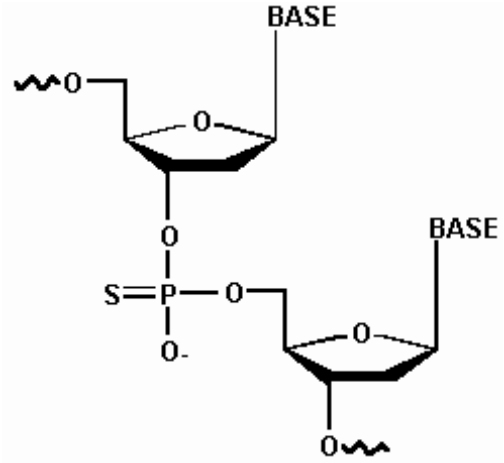
[0118] Los conjugados de oligómero antisentido también pueden contener subunidades de ácido nucleico desbloqueado (UNA). Los UNA y oligómeros de UNA son un análogo del ARN en el que se ha escindido el enlace C2'-C3' de la subunidad. Mientras que el LNA está restringido conformacionalmente (en relación con el ADN y el ARN), el UNA es muy flexible. Los UNA se divulgan, por ejemplo, en el documento WO 2016/070166. Se ilustra más adelante un ejemplo no limitante de un UNA.



[0119] Los enlazadores entre subunidades típicos incluyen restos de fosfodiéster y fosforotioato; como alternativa, pueden emplearse enlazadores que no contienen fósforo.

4. Fosforotioatos

[0120] Los "fosforotioatos" (o S-oligos) son una variante del ADN normal en los que se reemplaza por un azufre uno de los oxígenos no puenteantes. Se ilustra más adelante un ejemplo no limitante de un fosforotioato.



[0121] La sulfurización del enlace entre nucleótidos reduce la acción de las endo y exonucleasas, incluyendo la exonucleasa DNA POL 1 de 5' a 3' y de 3' a 5', las nucleasas S1 y P1, RNasas, nucleasas séricas y fosfodiesterasa de

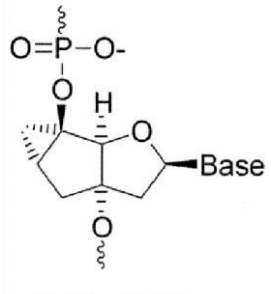
veneno de serpiente. Los fosforotioatos se preparan mediante dos rutas principales: mediante la acción de una solución de azufre elemental en disulfuro de carbono en un hidrógeno fosfonato o mediante el método de sulfurización de triésteres de fosfito con o bien disulfuro de tetraetiltiurano (TETD) o 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (BDTD) (véase, por ejemplo, Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad). Estos últimos métodos evitan el problema de la insolubilidad del azufre elemental en la mayoría de disolventes orgánicos y de toxicidad del disulfuro de carbono. Los métodos de TETD y BDTD también proporcionan fosforotioatos de mayor pureza.

5. Triciclo-ADN y subunidades de triciclo-fosforotioato

[0122] Los triciclo-ADN (tc-ADN) son una clase de análogos de ADN restringidos en los que se modifica cada nucleótido mediante la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional de la cadena principal y para optimizar la geometría del ángulo de torsión γ de la cadena principal. Los tc-ADN que contienen adenina y timina homobásicos 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 n.° WO 2010/115993, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de triciclo-ADN; en algunos casos, los conjugados de oligómero antisentido pueden estar compuestos completamente de subunidades de triciclo-ADN.

[0123] Las subunidades de triciclo-fosforotioato son subunidades de triciclo-ADN con enlaces entre subunidades de

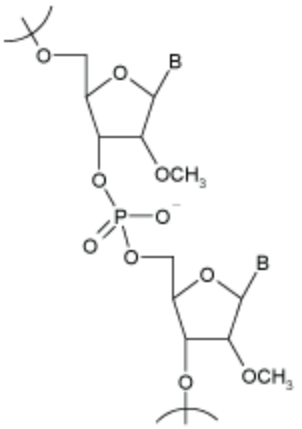
fosforotioato. Las subunidades de triciclo-fosforotioato y su síntesis se describen en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional n.° WO 2013/053928, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de triciclo-ADN; en algunos casos, los conjugados de oligómero antisentido pueden estar compuestos completamente de subunidades de triciclo-ADN. Se ilustra más adelante un ejemplo no limitante de una subunidad de triciclo-ADN/triciclo-fosforotioato.



triciclo-ADN

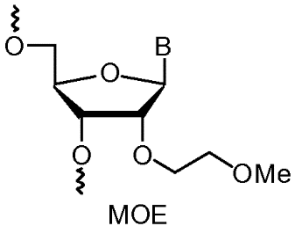
6. Oligómeros de 2' O-metilo, 2' O-MOE y 2'-F

[0124] Las moléculas de "oligómero de 2'-O-Me" portan un grupo metilo en el resto 2'-OH de la molécula de ribosa. Los 2'-O-Me-ARN muestran el mismo comportamiento (o similar) que el ADN, pero están protegidos frente a la degradación por nucleasas. Los 2'-O-Me-ARN también pueden combinarse con oligómeros de fosforotioato (PTO) para su estabilización adicional. Los oligómeros de 2'O-Me (fosfodiéster o fosforotioato) pueden sintetizarse de acuerdo con técnicas rutinarias en la técnica (véase, por ejemplo, Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad). A continuación se representa un ejemplo no limitante de un oligómero de 2'-O-Me.

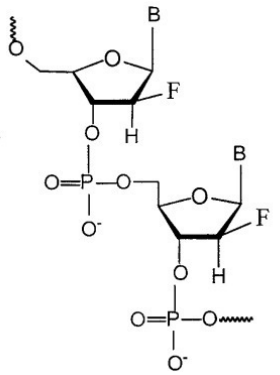


2' O-Me

[0125] Los oligómeros de 2' O-metoxietilo (2'-O MOE) portan un grupo metoxietilo en el resto 2'-OH de la molécula de ribosa y se analizan en Martin et al., *Helv. Chim. Acta,* 78, 486-504, 1995, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Se representa a continuación un ejemplo no limitante de una subunidad de 2'O MOE.



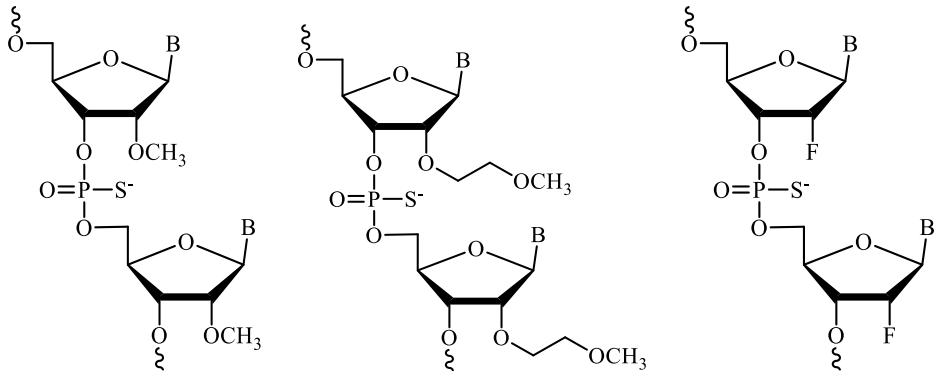
[0126] Los oligómeros de 2'-flúor (2'-F) tienen un radical flúor en la posición 2' en lugar del 2'OH. Se representa a continuación un ejemplo no limitante de un oligómero de a 2'-F.



2'-F

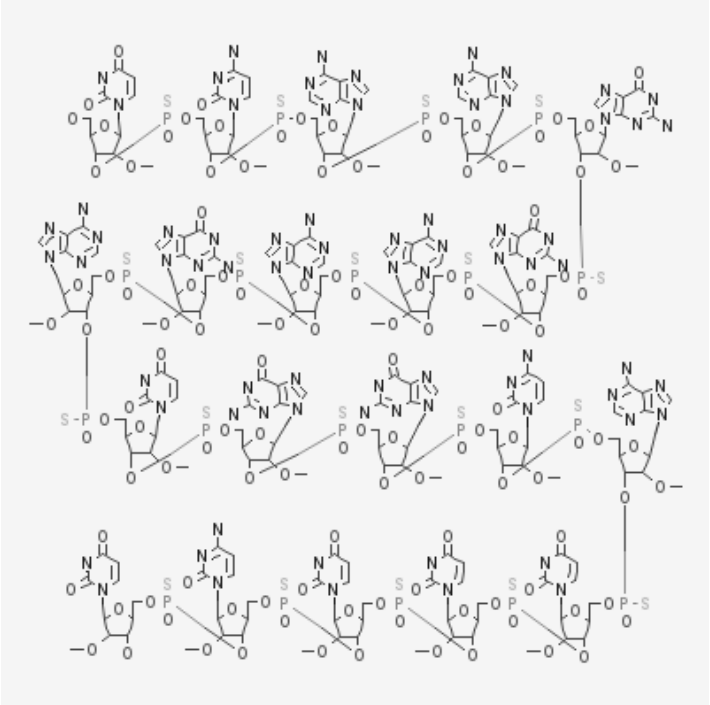
[0127] Los oligómeros de 2'-flúor se describen adicionalmente en el documento WO 2004/043977, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

[0128] Los oligómeros de 2'O-metilo, 2' O-MOE y 2'-F también pueden contener uno o más enlaces fosforotioato (PS) como se representa a continuación.

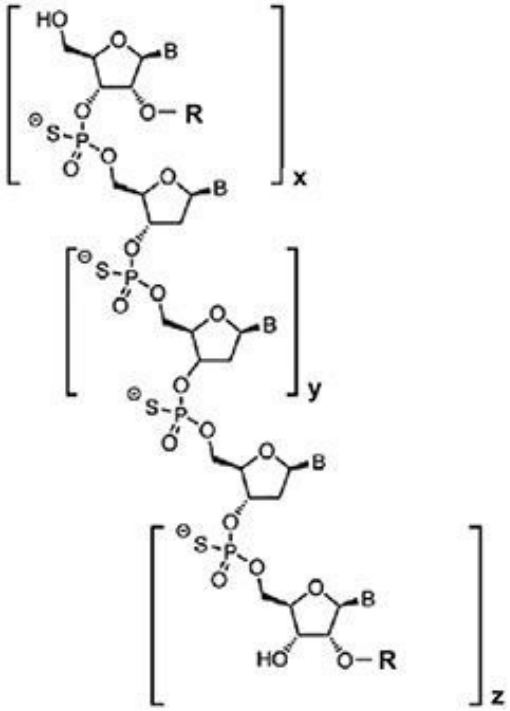


2'O-metil PS 2'O-MOE PS 2'-F PS

[0129] Además, los oligómeros de 2'O-metilo, 2' O-MOE u 2'-F pueden comprender enlaces PS entre subunidades a lo largo del oligómero, por ejemplo, como en el oligómero de 2'O-metil PS, Drisapersen, representado a continuación.



[0130] Como alternativa, los oligómeros de 2' O-metilo, 2' O-MOE, y/o 2'-F pueden comprender enlaces PS en los extremos del oligómero, como se ilustra más adelante.



donde:

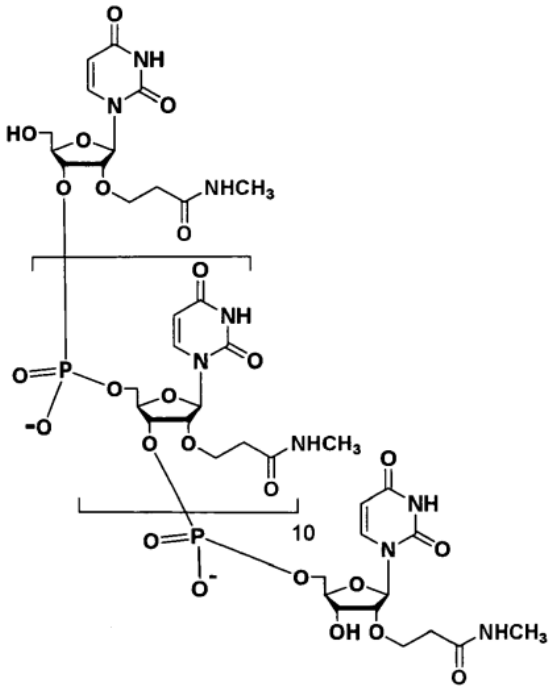
R es $CH_2CH_2OCH_3$ (metoxietilo o MOE); y

x, y y z indican el número de nucleótidos contenidos en cada una de las regiones de ala 5', hueco central y ala 3' designadas, respectivamente.

[0131] Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de 2'O-metilo, 2'-O-MOE y 2'-F y pueden utilizar cualquiera de los enlaces entre subunidades aquí descritos. En algunos casos, un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación puede estar compuesto completamente de subunidades de 2'O-metilo, 2'O-MOE o 2'-F. Una realización de conjugados de oligómero antisentido de la divulgación está compuesta completamente de subunidades de 2'O-metilo.

7. Oligómeros de 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil) etilo] (MCE)

[0132] Los MCE son otro ejemplo de ribonucleósidos 2'O modificados útiles en los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación. En este caso, el 2'OH se derivatiza a un resto de 2-(N-metilcarbamoil)etilo para aumentar la resistencia a nucleasas. Se ilustra más adelante un ejemplo no limitante de un oligómero de MCE.



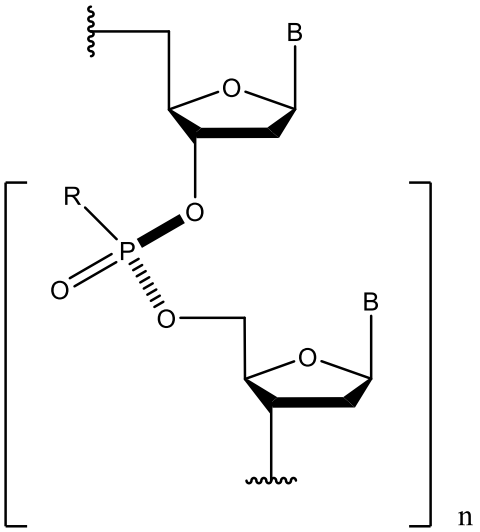
MCE

[0133] Los MCE y su síntesis se describen en Yamada et al., *J. Org. Chem.* (2011) 76(9):3042-53, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de MCE.

8. Oligómeros estereoespecíficos

[0134] Los oligómeros estereoespecíficos son aquellos en los que la estereoquímica de cada enlace que contiene fósforo se fija mediante el método de síntesis, de tal forma que se produce un oligómero sustancialmente estereopuro. Se

representa a continuación un ejemplo no limitante de un oligómero estereoespecífico.



[0135] En el ejemplo anterior, cada fósforo del oligómero tiene la misma estereoconfiguración. Los ejemplos adicionales incluyen los oligómeros descritos anteriormente. Por ejemplo, los oligómeros de LNA, ENA, triciclo-ADN, MCE, 2'O-metilo, 2'O-MOE, 2'-F y a base de morfolino pueden prepararse con enlaces entre nucleósidos que contienen fósforos estereoespecíficos tales como, por ejemplo, enlaces entre nucleósidos de fosforotioato, fosfodiéster, fosforamidato, fosforodiamidato u otros que contienen fósforo. Los oligómeros estereoespecíficos, los métodos de preparación, la síntesis quiral controlada, el diseño quiral y los adyuvantes quirales para su uso en la preparación de dichos oligómeros se detallan, por ejemplo, en los documentos WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858 y WO2011005761, cada uno de los cuales se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

[0136] Los oligómeros estereoespecíficos pueden tener enlaces entre nucleósidos que contienen fósforo en una

configuración R_P o S_P. Los enlaces quirales que contienen fósforo en los que se controla la estereoconfiguración de los enlaces se denominan "estereopuros", mientras que los enlaces quirales que contienen fósforo en los que la estereoconfiguración de los enlaces no está controlada se citan como "estereoaleatorios". En ciertas realizaciones, los oligómeros de la divulgación comprenden una pluralidad de enlaces estereopuros y estereoaleatorios, de tal forma que el oligómero resultante tiene subunidades estereopuras en posiciones preespecificadas del oligómero. Se proporciona un ejemplo de la ubicación de las subunidades estereopuras en la Publicación de Solicitud Internacional de Patente número WO 2017/062862 A2 en las figuras 7A y 7B. En una realización, todos los enlaces quirales que contienen fósforo en un oligómero son estereoaleatorios. En una realización, todos los enlaces quirales que contienen fósforo en un oligómero son estereopuros.

[0137] En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), todos los n de los enlaces quirales que contienen fósforo en el oligómero son estereoaleatorios. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), todos los n de los enlaces quirales que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 10% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 20% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una

realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 30% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 40% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 50% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 60% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 70% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 80% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos un 90% (hasta el número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros.

[0138] En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 2 enlaces

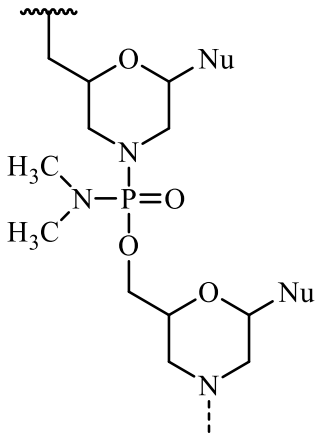
estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 3 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 4 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 5 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 6 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 7 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 8 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 9 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir,

o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 10 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 11 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 12 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 13 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 14 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 15 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 16 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo

(donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 17 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 18 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 19 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 20 enlaces estereopuros que contienen fósforo contiguos con la misma estéreo orientación (es decir, o S_P o R_P).

9. Oligómeros de morfolino

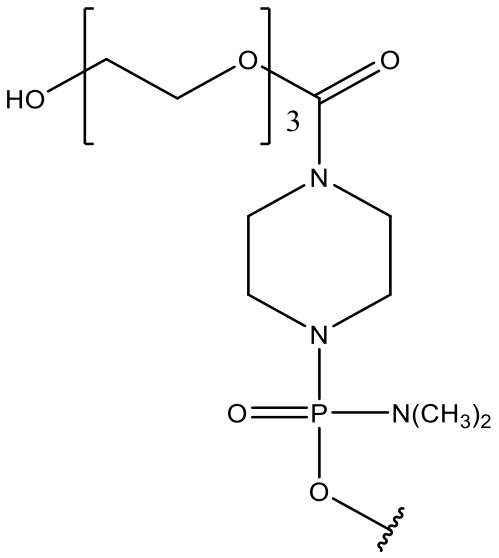
[0139] Las realizaciones ejemplares de la divulgación se refieren a oligómeros de morfolino de fosforodiamidato de la siguiente estructura general:



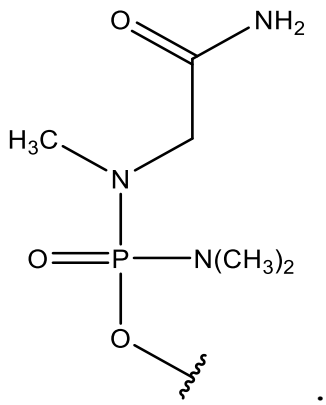
y como se describe en la figura 2 de Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Se pretende que los morfolinos como se describen en

el presente documento abarquen todos los estereoisómeros y tautómeros de la estructura general anterior. La síntesis, las estructuras y las características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las Patentes de los Estados Unidos n.°: 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 al presente documento por referencia.

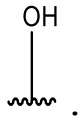
[0140] En determinadas realizaciones, un morfolino está conjugado en el extremo 5' o 3' del oligómero con un resto de "cola" para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas a modo de ejemplo incluyen:



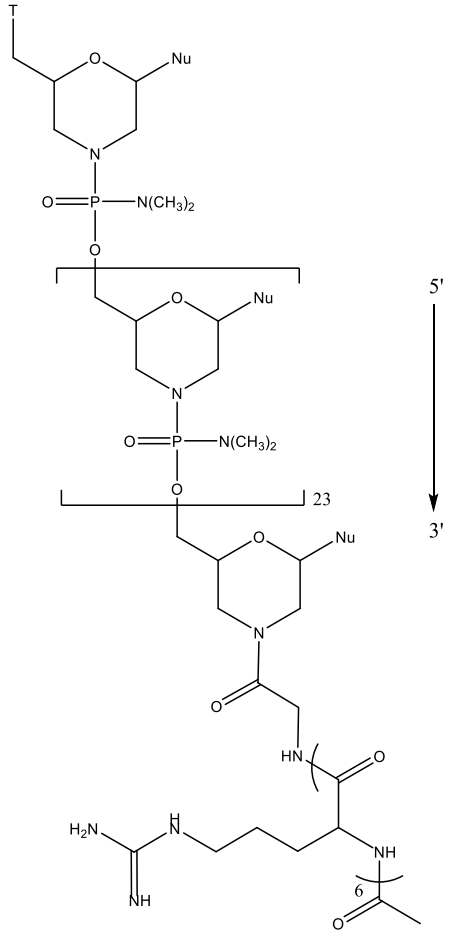
;



; y



[0141] En diversas realizaciones, un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación es de acuerdo con la fórmula (I):

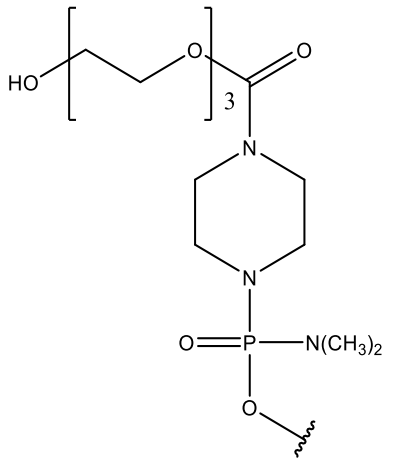


(I)

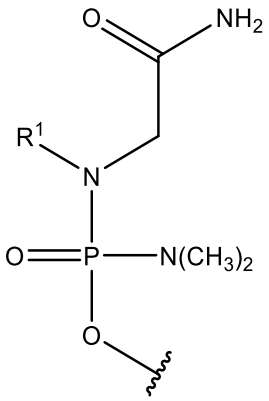
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto, forma una secuencia de direccionamiento;

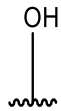
T es un resto seleccionado entre:



;



; y

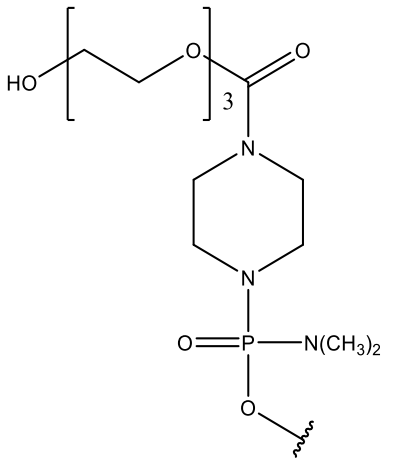


;

R^1 es alquilo C_1-C_6;

en donde la secuencia de direccionamiento es complementaria a un sitio de hibridación con el exón 53 en el pre-ARNm de distrofina designado como H53A(+36+60).

[0142] En diversas realizaciones, T es



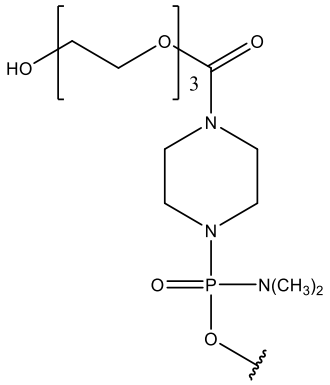
.

[0143] En diversas realizaciones, R^1 es metilo, CF_3, CCl_3, $CFCl_2$, CF_2Cl, etilo, CH_2CF_3, CF_2CF_3, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo o 2,3-dimetilbutilo.

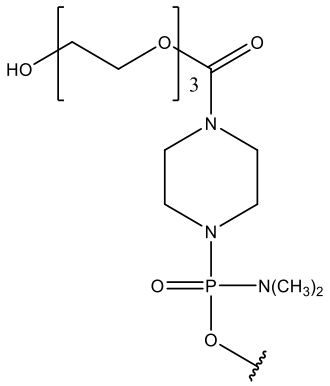
[0144] En algunas realizaciones, un conjugado de oligómero antisentido de fórmula (I) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) del mismo. En ciertas realizaciones, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

[0145] En algunas realizaciones, cada Nu se selecciona independientemente entre citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U) e hipoxantina (I).

[0146] En algunas realizaciones, la secuencia de direccionamiento es la SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'), en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U).

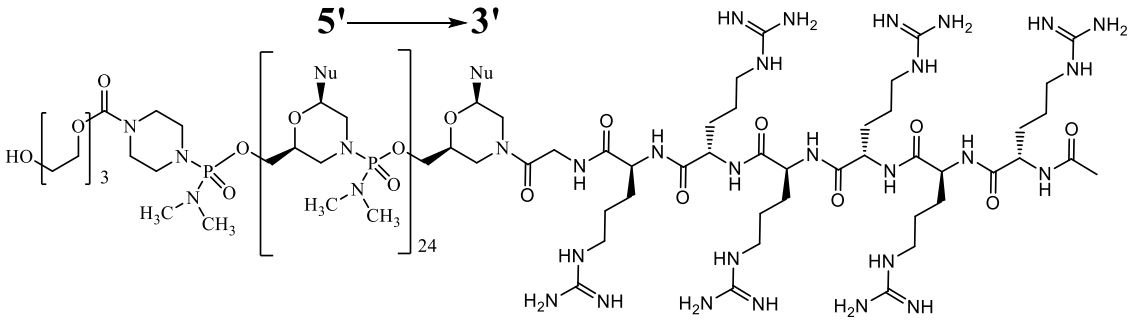
[0147] En diversas realizaciones, T es 

, y la secuencia de direccionamiento es la SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'), en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U).

[0148] En diversas realizaciones, T es 

, y la secuencia de direccionamiento es la SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3').

[0149] En algunas realizaciones, incluyendo, por ejemplo, algunas realizaciones de fórmula (I), un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación es de acuerdo con la fórmula (II):



(II)

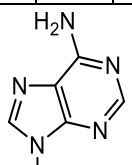
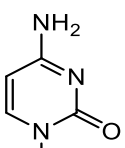
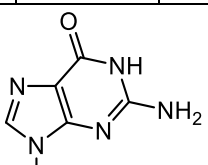
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

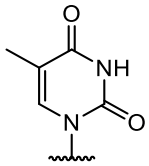
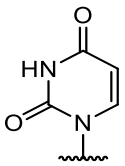
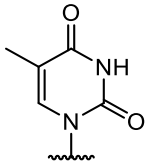
cada Nu es una nucleobase que tomadas en conjunto forman una secuencia de direccionamiento que es complementaria a un sitio de hibridación del exón 53 en el pre-ARNm de distrofina designado como H53A(+36+60).

[0150] En algunas realizaciones, cada Nu se selecciona independientemente entre citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U) e hipoxantina (I).

[0151] En diversas realizaciones, cada Nu de 1 a 25 y de 5' a 3' es (SEQ ID NO: 1):

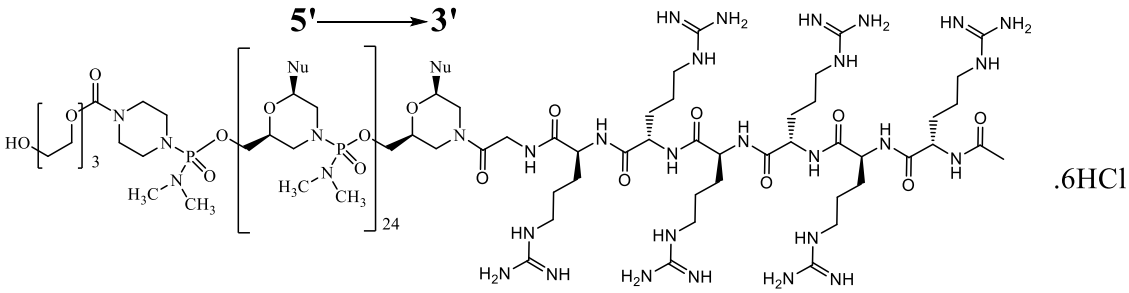
Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C

en donde A es  , C es  , G es  y

X es  o  . En ciertas realizaciones, cada X es independientemente  .

[0152] En algunas realizaciones, un conjugado de oligómero antisentido de fórmula (II) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) del mismo. En ciertas realizaciones, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

[0153] En algunas realizaciones, incluyendo, por ejemplo, algunas realizaciones de fórmula (II), un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación es de acuerdo con la fórmula (IIA):



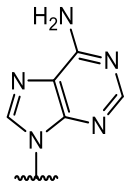
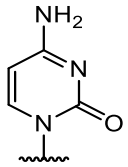
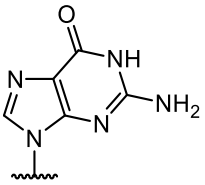
(IIA)

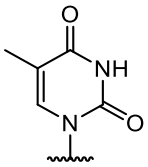
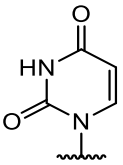
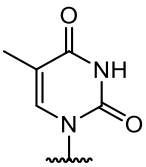
en donde cada Nu es una nucleobase que tomadas en conjunto forman una secuencia de direccionamiento que es complementaria a un sitio de hibridación del exón 53 en el pre-ARNm de distrofina designado como H53A(+36+60).

[0154] En algunas realizaciones, cada Nu se selecciona independientemente entre citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U) e hipoxantina (I).

[0155] En diversas realizaciones, cada Nu de 1 a 25 y de 5' a 3' es (SEQ ID NO: 1):

Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C

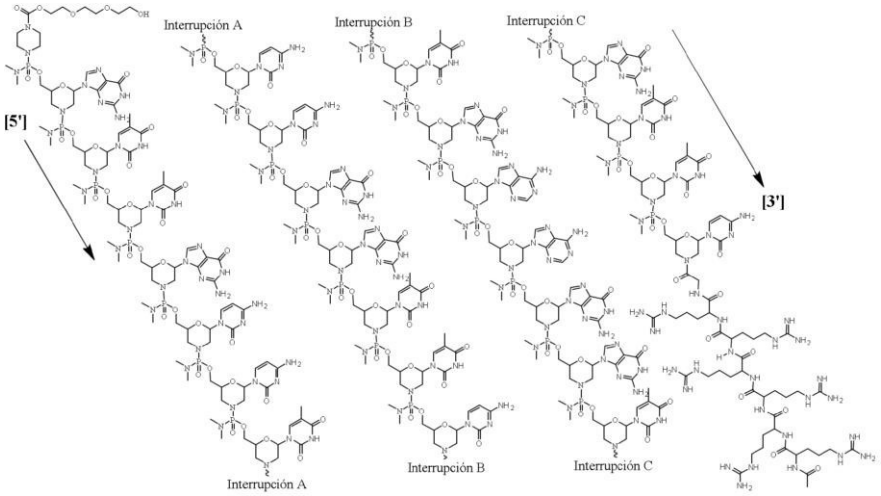
en donde A es  , C es  , G es 

y X es  o  . En ciertas realizaciones, cada X es  .

[0156] En algunas realizaciones que incluyen, por ejemplo, realizaciones de conjugados de oligómero antisentido de fórmula (II) y fórmula (IIA), la secuencia de direccionamiento es la SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'), en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U). En diversas realizaciones que incluyen, por ejemplo, realizaciones de conjugados de oligómero antisentido de fórmula (II) y fórmula (IIA), la secuencia de direccionamiento es la SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3').

[0157] En algunas realizaciones, que incluyen, por ejemplo, realizaciones de conjugados de oligómero

antisentido de fórmula (I), un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación es de acuerdo con la fórmula (III):

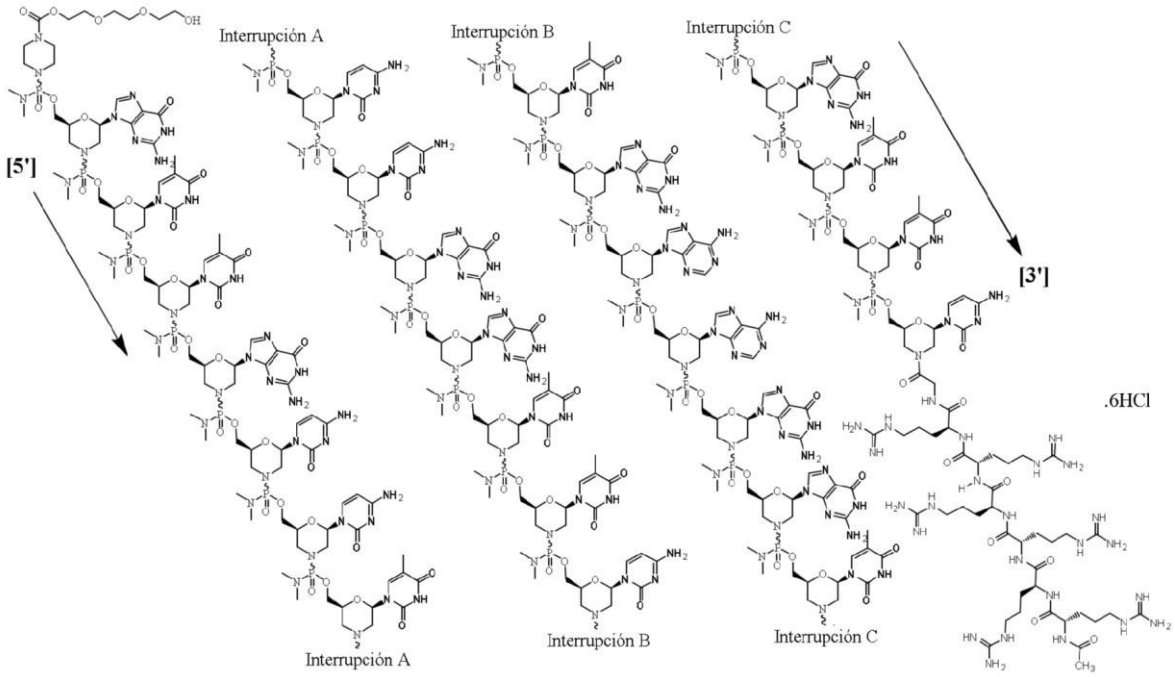


(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

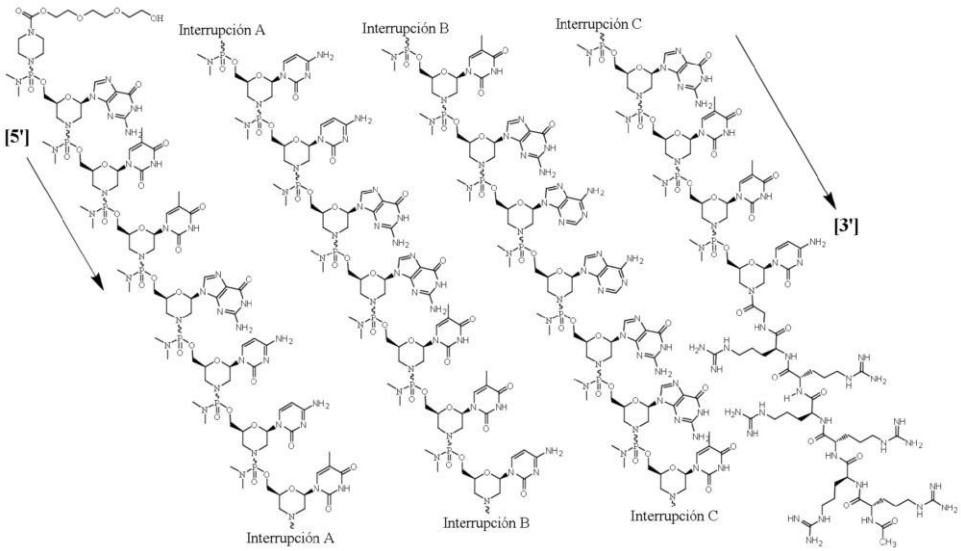
[0158] En algunas realizaciones, un conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) del mismo. En ciertas realizaciones, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

[0159] En algunas realizaciones, que incluyen, por ejemplo, realizaciones de conjugados de oligómero antisentido de fórmula (III), un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación es de acuerdo con la fórmula (IIIA):



(IIIA).

[0160] En algunas realizaciones de la divulgación, que incluyen algunas realizaciones de conjugados de oligómero antisentido de fórmula (I) y realizaciones de conjugados de oligómero antisentido de fórmula (III), el conjugado de oligómero antisentido es de acuerdo con la fórmula (IV):

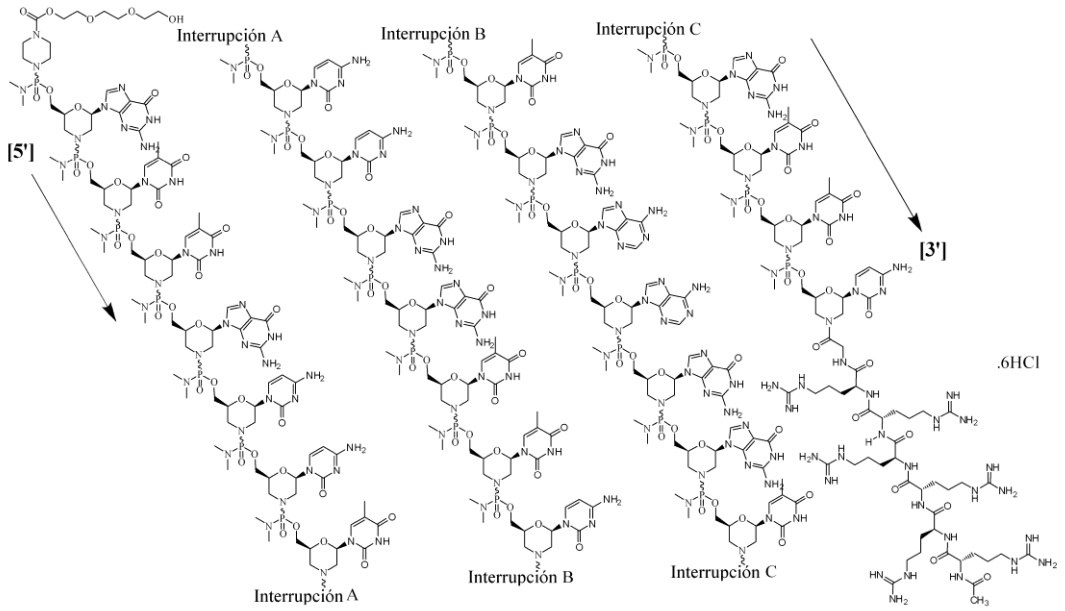


(IV)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0161] En algunas realizaciones, un conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) del mismo. En ciertas realizaciones, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

[0162] En algunas realizaciones, que incluyen, por ejemplo, realizaciones de conjugados de oligómero antisentido de fórmula (IV), un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación es de acuerdo con la fórmula (IVA):



(IVA).

10. Modificaciones y sustituciones de nucleobase

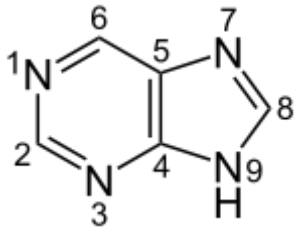
[0163] En ciertas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación están compuestos de nucleobases de ARN y nucleobases de ADN (normalmente citados en la técnica simplemente como "base"). Las bases de ARN se conocen comúnmente como adenina (A), uracilo (U), citosina (C) y guanina (G). Las bases de ADN se conocen comúnmente como adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación están compuestos de citosina

(C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U) e hipoxantina (I).

[0164] En algunas realizaciones, un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación comprende una secuencia de nucleobases que tomada en conjunto, forma una secuencia de direccionamiento en donde la secuencia de direccionamiento es complementaria a un sitio de hibridación con el exón 53 en el pre-ARNm de distrofina designado como H53A(+36+60). En diversas realizaciones, la secuencia de nucleobases comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de nucleobases consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleobases comprende una secuencia que tiene una eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleobases en la secuencia de SEQ ID NO: 1. En diversas realizaciones, la secuencia de nucleobases consiste en una secuencia que tiene una eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleobases en la secuencia de SEQ ID NO: 1. En diversas realizaciones, la secuencia de direccionamiento tiene una región complementaria a al menos una serie de tres o más nucleobases contiguas idénticas en el sitio de hibridación, en donde el sitio de hibridación comprende al menos una nucleobase adicional en comparación con la región de la secuencia de direccionamiento y la al menos una nucleobase adicional no tiene una nucleobase complementaria en la región de la secuencia de direccionamiento y en donde la región de direccionamiento complementaria a la al menos una serie de tres o más nucleobases contiguas idénticas es interna respecto de la secuencia de direccionamiento, cuyos ejemplos pueden encontrarse en la Patente de los Estados Unidos con n.° de serie 62/573,985, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

[0165] En ciertas realizaciones, se pueden modificar o sustituir una o más bases de ARN o bases de ADN en un oligómero con una base distinta de una base de ARN o una base de ADN. Los oligómeros que contienen una base modificada o sustituida incluyen oligómeros en los que se reemplazan una o más bases de purina o pirimidina más comúnmente encontradas en los ácidos nucleicos con bases menos comunes o no naturales.

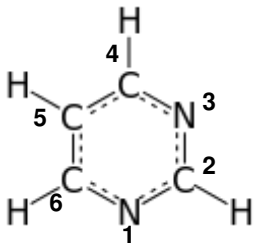
[0166] Las bases de purina comprenden un anillo de pirimidina condensado a un anillo de imidazol, como se describe por la siguiente fórmula general.



Purina

[0167] La adenina y la guanina son las dos nucleobases de purina más comúnmente encontradas en los ácidos nucleicos. Otras purinas de origen natural incluyen, pero sin limitación, N^6-metiladenina, N^2-metilguanina, hipoxantina y 7-metilguanina.

[0168] Las bases de pirimidina comprenden un anillo de pirimidina de seis miembros como se describe por la siguiente fórmula general.



Pirimidina

[0169] La citosina, el uracilo y la timina son las bases de pirimidina más comúnmente encontradas en los ácidos

nucleicos. Otras pirimidinas de origen natural incluyen, pero sin limitación, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, seudouracilo y 4-tiouracilo. En una realización, los oligómeros descritos en el presente documento contienen bases de timina en lugar de uracilo.

[0170] Otras bases adecuadas incluyen, pero sin limitación: 2,6-diaminopurina, ácido orótico, agmatidina, losidina, 2-tiopirimidinas (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), pinza de G y sus derivados, pirimidinas 5-sustituidas (por ejemplo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Súper T), 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-desazaguanina, 8-aza-7-desazaadenina, 8-aza-7-desaza-2,6-diaminopurina, Súper G, Súper A y N4-etilcitosina o derivados de las mismas; N^2-ciclopentilguanina (cPent-G), N^2-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) y N^2-propil-2-aminopurina (Pr-AP), seudouracilo o derivados de las mismas; y bases degeneradas o universales, como 2,6-difluorotolueno o bases ausentes, tales como sitios abásicos (por ejemplo, 1-desoxirribosa, 1,2-didesoxirribosa, l-desoxi-2-O-metilribosa; o derivados de pirrolidina en los que el oxígeno del anillo se ha reemplazado con nitrógeno (azarribosa)). Los ejemplos de derivados de Súper A, Súper G y Súper T pueden encontrarse en la Patente de los Estados Unidos 6,683,173 (Epoch Biosciences), que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad. Se ha demostrado que cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducen los efectos inmunoestimulantes cuando se incorporan en el ARNpi (Peacock H. et al. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200). El pseudouracilo es una versión isomerizada de origen natural del uracilo, con un C-glucósido en lugar del N-glucósido

normal, 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 (documento WO 2009127230, incorporado al presente documento por referencia en su totalidad).

[0171] Ciertas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones con 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0.6-1.2 °C y en la actualidad son sustituciones de bases preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar de 2'-O-metoxietilo. Las nucleobases modificadas adicionales ejemplares incluyen aquellas en donde al menos un átomo de hidrógeno de la nucleobase se reemplaza con flúor.

11. Sales farmacéuticamente aceptables de los conjugados de oligómero antisentido

[0172] Ciertas realizaciones de los conjugados de oligómero antisentido descritos en el presente documento pueden contener un grupo funcional básico, tal como un amino o alquilamino y por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables", a este respecto, se refiere a las sales de adición de ácido relativamente no tóxicas inorgánicas y orgánicas de los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación. Estas sales pueden prepararse *in situ* en el vehículo de administración o en el proceso de fabricación de la forma farmacéutica o haciendo reaccionar

por separado un conjugado de oligómero antisentido purificado de la divulgación en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal formada de este modo 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, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19).

[0173] Las sales farmacéuticamente aceptables de los presentes conjugados de oligómero antisentido incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los conjugados de oligómero antisentido, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, tales sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, 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, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotiónico, y similares.

[0174] En determinadas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables", en estos casos, se refieren a las sales de adición de bases inorgánicas y orgánicas

relativamente no tóxicas de los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación. Estas sales pueden prepararse igualmente *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma farmacéutica o haciendo reaccionar por separado el conjugado de oligómero antisentido 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 amoniaco o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de las sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al., citado anteriormente).

III. Formulaciones y modos de administración

[0175] En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona formulaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro terapéutico de conjugados de oligómero antisentido, como se describe en el presente documento. Por tanto, en ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los conjugados de oligómero antisentido descritos en el presente documento, formuladas junto con uno o más portadores (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Aunque es posible administrar solo el conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación, es preferible administrar el conjugado de oligómero antisentido en forma de una formulación (composición) farmacéutica. En una realización, el conjugado

de oligómero antisentido de la formulación es de acuerdo con la fórmula (III).

[0176] Los métodos para el suministro de moléculas de ácido nucleico que pueden ser aplicables a los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación se describen, por ejemplo, en: Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; y Sullivan et al., documento PCT WO 94/02595. Pueden utilizarse estos y otros protocolos para el suministro de prácticamente cualquier molécula de ácido nucleico, incluyendo los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación.

[0177] Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden formularse especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluyendo aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pociones (suspensiones o disoluciones acuosas o no acuosas), comprimidos, (destinados para absorción bucal, sublingual o sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, pomada o un parche de liberación controlada o pulverización aplicada a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un óvulo vaginal, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) por vía nasal.

[0178] Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y

sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (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 ceras de 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 polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) disolución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) disoluciones de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

[0179] Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes adecuados para la formulación con los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación incluyen: Ácidos nucleicos conjugados con PEG; ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos; ácidos nucleicos que contienen restos lipófilos; fosforotioatos; inhibidores de P-glicoproteína (tales como Pluronic P85) que pueden potenciar la entrada de fármacos en diversos tejidos; polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(D,L-lactida-coglicolida) para administración por liberación sostenida tras la implantación (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas, tales 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).

[0180] La divulgación también presenta el uso de la composición que comprende liposomas modificados en la superficie que contienen lípidos de poli(etilenglicol) ("PEG") (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o combinaciones de los mismos, o liposomas de circulación prolongada o liposomas ocultos). Los conjugados de oligómero de la divulgación también pueden comprender moléculas de PEG unidas covalentemente de diversos pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en tejidos diana. Esta clase de portadores de fármacos resisten la opsonización y eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), permitiendo de ese modo tiempos de circulación en sangre más prolongados y exposición tisular potenciada 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 mostrado que tales liposomas se acumulan selectivamente en tumores, presumiblemente mediante extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Los liposomas de circulación prolongada potencian la farmacocinética y farmacodinámica del ADN y ARN, particularmente en comparación con liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en tejidos del MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., publicación PCT internacional n.° WO 96/10391; Ansell et al., publicación PCT internacional n.° WO 96/10390; Holland et al., publicación PCT internacional n.° WO 96/10392). También es probable que los liposomas de circulación prolongada protejan a los fármacos de la

degradación por nucleasas en un mayor grado en comparación con liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en tejidos de MPS metabólicamente agresivos tales como el hígado y el bazo.

[0181] En una realización adicional, la presente divulgación incluye composiciones farmacéuticas de conjugado de oligómero antisentido preparadas para su suministro como se describe en las Patentes de los Estados Unidos n.°: 6,692,911; 7,163,695; y 7,070,807. A este respecto, en una realización, la presente divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación en una composición que comprende copolímeros de lisina e histidina (HK) (como se describe en las Patentes de los Estados Unidos n.°: 7,163,695, 7,070,807 y 6,692,911) o bien solos o bien en combinación con PEG (por ejemplo, PEG ramificado o no ramificado o una mezcla de ambos), en combinación con PEG y un resto de direccionamiento o cualquiera de los anteriores en combinación con un agente de reticulación. En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido en composiciones farmacéuticas que comprenden polihistidina modificada con ácido glucónico o polihistidina gluconilada/transferrina-polilisina. Un experto en la materia también reconocerá que aminoácidos con propiedades similares a His y Lys pueden sustituirse dentro de la composición.

[0182] También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes (Tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio), agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

[0183] 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 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 etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

[0184] Las formulaciones de la presente divulgación incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que está tratándose y el modo de administración particular. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una sola forma farmacéutica será generalmente aquella cantidad del principio activo que produce un efecto terapéutico. En general, esta cantidad oscilará entre aproximadamente el 0.1 por ciento y aproximadamente el noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente entre aproximadamente el 5 por ciento y aproximadamente el 70 por ciento, lo más preferentemente entre aproximadamente el 10 por ciento y aproximadamente el 30 por ciento.

[0185] En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación comprende un excipiente

seleccionado de ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes formadores de micelas, por ejemplo, ácidos biliares, y portadores poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación. En una realización, el conjugado de oligómero antisentido de la formulación es de acuerdo con la fórmula (III). En determinadas realizaciones, una formulación mencionada anteriormente hace que un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación esté biodisponible por vía oral.

[0186] Los métodos de preparación de estas formulaciones o composiciones farmacéuticas incluyen la etapa de asociar un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación con el portador y, opcionalmente, uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación con portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto.

[0187] Las formulaciones de la divulgación adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación como principio activo. Un conjugado de oligómero antisentido de la presente

divulgación también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

[0188] En formas farmacéuticas sólidas de la divulgación para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, comprimidos recubiertos de azúcar, polvos, gránulos, trociscos y similares), el principio activo puede mezclarse con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la disolución, 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 tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla 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, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes tamponantes. También pueden emplearse composiciones farmacéuticas sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina de vaina

dura y blanda usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

[0189] Un comprimido puede prepararse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Los comprimidos preparados por compresión pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente activo de superficie o de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden prepararse mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

[0190] Los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, tales como comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y vainas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. Pueden formularse también para proporcionar liberación lenta o controlada del principio activo en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden formularse para liberación rápida, por ejemplo, secados por congelación. Pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención de 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 pueden contener también opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que libera(n) el/los principio(s) activo(s) solos, o preferentemente, en una determinada porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de una manera retardada. Los ejemplos de composiciones de incrustación que pueden usarse incluyen ceras y sustancias poliméricas. El principio activo puede estar también en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

[0191] Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral de los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, 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 semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, y mezclas de los mismos.

[0192] Además de diluyentes inertes, las composiciones farmacéuticas orales pueden incluir también adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, de perfume y conservantes.

[0193] Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por

ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

[0194] Las formulaciones para administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que puede prepararse mezclando uno o más compuestos de la divulgación con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorios o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

[0195] Las formulaciones o formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un oligómero tal como se proporciona en el presente documento incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches e inhalantes. Los conjugados de oligómero activo pueden mezclarse en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda necesitarse. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta divulgación, 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.

[0196] Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propelentes

habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

[0197] Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar administración controlada de un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación al cuerpo. Dichas formas farmacéuticas pueden prepararse disolviendo o dispersando el oligómero en el medio apropiado. También pueden usarse potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del agente a través de la piel. La velocidad de tal flujo puede controlarse o bien proporcionando una membrana de control de la velocidad o bien dispersando el agente en una matriz polimérica o gel, entre otros métodos conocidos en la técnica.

[0198] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más conjugados de oligómero de la divulgación en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse para dar disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes espesantes o de suspensión. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación 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. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante

el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. En una realización, el conjugado de oligómero antisentido de la composición farmacéutica es de acuerdo con la fórmula (III).

[0199] Estas composiciones farmacéuticas pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la acción de microorganismos sobre los presentes conjugados de oligómero puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. Puede ser deseable también incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ocasionarse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

[0200] En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material amorfo o cristalino que tiene escasa 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 de cristal y la forma cristalina. Alternativamente, se logra la absorción retardada de una forma de fármaco administrada de manera parenteral disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

[0201] Pueden prepararse formas de depósito inyectables formando matrices microencapsuladas de los presentes

conjugados de oligómero en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la relación de oligómero a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación del oligómero puede controlarse. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). También pueden prepararse formulaciones inyectables de depósito atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con tejidos corporales.

[0202] Cuando los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación se administran como agentes farmacéuticos a seres humanos y animales, pueden administrarse tal cual o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de un 0.1 a un 99% (más preferentemente de un 10 a un 30%) del conjugado de oligómero antisentido en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

[0203] Las formulaciones o preparaciones de la presente divulgación pueden administrase por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Se administran normalmente en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsulas, mediante inyección, inhalación, loción ocular, pomada, supositorio o infusión; por vía tópica mediante una loción o pomada; o por vía rectal mediante supositorios.

[0204] Independientemente de la vía de administración seleccionada, los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada y/o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, pueden formularse en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en

las composiciones farmacéuticas de esta divulgación pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea inaceptablemente tóxica para el paciente.

[0205] El nivel de dosis seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del conjugado de oligómero antisentido particular de la presente divulgación empleado o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción o el metabolismo del oligómero particular que se esté empleando, la tasa y el alcance de la absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el oligómero particular empleado, la edad, el sexo, el peso, la afección, la salud general y el historial médico previo del paciente que se esté tratando y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

[0206] Un médico o veterinario que tiene experiencia habitual en la técnica puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar dosis de los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logra el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación será aquella cantidad del conjugado de oligómero antisentido que es la dosis mínima eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores

descritos en el presente documento. En general, las dosis orales, intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación para un paciente, cuando se usan para los efectos indicados, variarán de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día.

[0207] En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación se administran en dosis generalmente de aproximadamente 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunos casos, pueden ser necesarias dosis mayores de 160 m/kg. En algunas realizaciones, las dosis para administración i.v. son de aproximadamente 0.5 mg a 160 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran a dosis de aproximadamente 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran a dosis de aproximadamente 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 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 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, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, incluyendo todos los números enteros intermedios. En algunas realizaciones, el oligómero se administra a 10 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero se administra a 20 mg/kg. En algunas

realizaciones, el oligómero se administra a 30 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero se administra a 40 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero se administra a 60 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero se administra a 80 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero se administra a 160 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero se administra a 50 mg/kg.

[0208] En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra en dosis generalmente de aproximadamente 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) para administración i.v. son de aproximadamente 0.5 mg a 160 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a dosis de aproximadamente 0.5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a dosis de aproximadamente 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 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 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, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, incluyendo todos los números enteros intermedios. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 10 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado

de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 20 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 30 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 40 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 60 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 80 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 160 mg/kg. En algunas realizaciones, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) se administra a 50 mg/kg.

[0209] Si se desea, la dosis diaria eficaz del principio activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos adecuados a lo largo de todo el día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. En situaciones determinadas, la dosificación es una administración al día. En ciertas realizaciones, la dosificación es una o más administraciones 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, según se necesite, para mantener la expresión deseada de una proteína distrofina funcional. En determinadas realizaciones, la dosificación es una o más administraciones una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la dosificación es una administración una vez cada dos semanas. En diversas realizaciones, la dosificación es una o más administraciones cada mes. En ciertas realizaciones, la dosificación es una administración cada mes.

[0210] En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 10

mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 20 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 30 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 40 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 60 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 80 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 100 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 160 mg/kg. Como se usa en el presente documento, se entiende que semanalmente tiene el significado aceptado en la técnica de cada semana.

[0211] En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 10 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 20 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 30 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 40 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 60 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 80 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 100 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 160 mg/kg. Como se usa en el presente documento, se entiende que

bisemanalmente tiene el significado aceptado en la técnica de cada dos semanas.

[0212] En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 10 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 20 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 30 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 40 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 60 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 80 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 100 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 160 mg/kg. Como se usa en el presente documento, se entiende que cada tres semanas tiene el significado aceptado en la técnica de una vez cada tres semanas.

[0213] En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 10 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 20 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 30 mg/kg. En diversas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 40 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 60 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 80 mg/kg. En

algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 100 mg/kg. En algunas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 160 mg/kg. Como se usa en el presente documento, se entiende que mensualmente tiene el significado aceptado en la técnica para cada mes.

[0214] Como se entenderá en la técnica, las administraciones semanales, bisemanales, cada tres semanas o mensuales pueden ser en una o más administraciones o subdosis como se analiza en el presente documento.

[0215] Las moléculas de ácido nucleico y los conjugados de oligómero antisentido descritos en el presente documento pueden administrarse a células mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo, pero sin limitación, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis o mediante incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. En determinadas realizaciones, puede utilizarse tecnología de microemulsificación para mejorar la biodisponibilidad de agentes farmacéuticos lipófilos (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 microemulsificación proporciona una biodisponibilidad potenciada dirigiendo preferentemente la absorción al sistema linfático en lugar del sistema circulatorio, que de ese modo sortea el hígado, e impide la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.

[0216] En un aspecto de la divulgación, las formulaciones contienen micelas formadas a partir de un

oligómero tal como se proporciona en el presente documento y al menos un portador anfífilo, en el que las micelas tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 100 nm. Realizaciones más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio menor de aproximadamente 50 nm, e incluso realizaciones más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio menor de aproximadamente 30 nm, o incluso menor de aproximadamente 20 nm.

[0217] Aunque se contemplan todos los portadores anfífilos adecuados, los portadores actualmente preferidos son generalmente los que tienen un estatus generalmente reconocido como seguro (GRAS), y que pueden tanto solubilizar un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación como microemulsionar en una fase posterior cuando la disolución se pone en contacto con una fase acuosa compleja (tal como una encontrada en el tracto gastrointestinal humano). Habitualmente, los componentes anfífilos que satisfacen estos requisitos tienen valores de HLB (equilibrio hidrófilo con respecto a lipófilo) de 2-20, y sus estructuras contienen radicales alifáticos de cadena lineal en el intervalo de C-6 a C-20. Ejemplos son polietilenglicoles y glicéridos grasos polietilenglicolizados.

[0218] Los ejemplos de portadores anfífilos incluyen glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolizados saturados y monoinsaturados, tales como los obtenidos a partir de diversos aceites vegetales completa o parcialmente hidrogenados. Dichos aceites pueden consistir ventajosamente en tri, di y mono glicéridos de ácidos grasos y ésteres de di y mono-poli(etilenglicol) de los ácidos grasos correspondientes, con una composición de ácido graso particularmente preferida, incluyendo ácido cáprico al 4-10%, ácido cáprico al 3-9%, ácido laurico al 40-50%, ácido

mirístico al 14-24%, ácido palmítico al 4-14% y ácido esteárico al 5-15%. Otra clase útil de portadores anfífilos incluye sorbitano y/o sorbitol parcialmente esterificados, con ácidos grasos saturados o mono-insaturados (serie SPAN) o análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).

[0219] Los portadores anfífilos disponibles comercialmente pueden ser particularmente útiles, incluyendo la serie Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglycol (todos fabricados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), PEG-mono-oleato, PEG-di-oleato, PEG-mono-laurato y di-laurato, lecitina, polisorbato 80, etc. (producidos y distribuidos por varias empresas en los EE.UU. y en todo el mundo).

[0220] En determinadas realizaciones, la administración puede producirse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden formularse para administración o bien encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similar. La formulación y el uso de tales vehículos de administración puede llevarse a cabo usando técnicas conocidas y convencionales.

[0221] Los polímeros hidrófilos adecuados para su uso en la presente divulgación son los que son fácilmente solubles en agua, pueden unirse covalentemente a un lípido formador de vesículas y que se toleran in vivo sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poli(ácido láctico) (también denominado polilactida), poli(ácido glicólico) (también denominado poliglicolida), un copolímero

de poli(ácido láctico)-poli(ácido glicólico) y poli(alcohol vinílico). En determinadas realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular medio en peso de aproximadamente 100 o 120 dalton hasta aproximadamente 5,000 o 10,000 dalton o desde aproximadamente 300 dalton hasta aproximadamente 5,000 dalton. En otras realizaciones, el polímero es poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular medio en peso de aproximadamente 100 a aproximadamente 5,000 dalton o que tiene un peso molecular medio en peso de aproximadamente 300 a aproximadamente 5,000 dalton. En ciertas realizaciones, el polímero es un poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular medio en peso de aproximadamente 750 dalton, por ejemplo, PEG(750). Los polímeros también pueden definirse por el número de monómeros en los mismos; una realización preferida de la presente divulgación utiliza polímeros de al menos aproximadamente tres monómeros, consistiendo dichos polímeros de PEG en tres monómeros que tienen un peso molecular de aproximadamente 132 dalton.

[0222] Otros polímeros hidrófilos que pueden ser adecuados para su uso en la presente divulgación incluyen polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida y celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

[0223] En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación comprende un polímero biocompatible seleccionado del grupo que consiste en poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, polímeros de polivinilo, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas, polipropileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poli(ácido bútico),

poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), polisacáridos, proteínas, poli(ácidos hialurónicos), policianoacrilatos, y combinaciones, mezclas o copolímeros de los mismos.

[0224] 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 están unidas mediante enlaces α-1,4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación en silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) están ubicados en un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 están situados en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrófilas, haciendo a las ciclodextrinas solubles en agua. En cambio, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrófobas, puesto 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 hidrófobos, incluyendo, por ejemplo, compuestos esteroides tales como 17α-estradiol (véase, por ejemplo, van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). La complejación tiene lugar mediante interacciones de Van der Waals y mediante formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de ciclodextrinas, véase, Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994).

[0225] Las propiedades fisicoquímicas de los derivados de ciclodextrinas dependen fuertemente de la clase y el grado de sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua oscila entre insoluble (por ejemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) y soluble al 147% (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos disolventes orgánicos. Las propiedades de las ciclodextrinas permiten el control sobre

la solubilidad de diversos componentes de la formulación aumentando o disminuyendo su solubilidad.

[0226] Se han descrito numerosas ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), et al. (Patente de los Estados Unidos n.° 3,453,259) y Gramera, et al. (Patente de los Estados Unidos n.° 3,459,731) describieron ciclodextrinas electroneutras. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), Patente de los Estados Unidos n.° 3,453,257], ciclodextrinas reticuladas insolubles (Solms, Patente de los Estados Unidos n.° 3,420,788), y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), Patente de los Estados Unidos n.° 3,426,011]. Entre los derivados de ciclodextrinas con propiedades aniónicas, se han añadido ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfónicos, ácidos tiosulfínicos y ácidos sulfónicos a la ciclodextrina original [véase, Parmeter (III), citado anteriormente]. Además, Stella, et al. han descrito derivados de sulfoalquil éter ciclodextrina (Patente de los Estados Unidos n.° 5,134,127).

[0227] Los liposomas consisten en al menos una membrana bicapa lipídica que encierra un compartimento interno acuoso. Los liposomas pueden caracterizarse por el tipo de membrana y por el tamaño. Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) tienen una sola membrana y normalmente oscilan entre un tamaño de 0.02 y 0.05 µm de diámetro; las vesículas unilamelares grandes (LUVS) son normalmente mayores de 0.05 µm. Las vesículas multilamelares y vesículas grandes oligolamelares tienen múltiples capas de membranas, habitualmente concéntricas y normalmente son 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.

[0228] Un aspecto de la presente divulgación se refiere a formulaciones que comprenden liposomas que contienen un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación, donde la membrana del liposoma se formula para proporcionar un liposoma con capacidad portadora aumentada. Como alternativa o además, el conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación puede estar contenido en o adsorbido sobre la bicapa liposomal del liposoma. Un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación puede agregarse con un tensioactivo lipídico y portarse dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma se formula para resistir los efectos disruptivos del agregado de agente activo-tensioactivo.

[0229] Según una realización de la presente divulgación, la bicapa lipídica de un liposoma contiene lípidos derivatizados con poli(etilenglicol) (PEG), de manera 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 hacia el entorno circundante.

[0230] Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente divulgación están en forma solubilizada. Los agregados del agente tensioactivo y activo (tales como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) pueden estar atrapados dentro del espacio interior de los liposomas según la presente divulgación. Un tensioactivo actúa dispersando y solubilizando el agente activo, y puede seleccionarse de cualquier tensioactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, incluyendo

pero sin limitarse a lisofosfatidilcolinas (LPG) biocompatibles de longitud de cadena variable (por ejemplo, desde aproximadamente C14 hasta aproximadamente C20). También pueden utilizarse lípidos derivatizados con polímeros tales como PEG-lípidos para la formación de micelas ya que actuarán inhibiendo la fusión de micelas/membranas, y ya que la adición de un polímero a moléculas de tensioactivo disminuye la CMC del tensioactivo y ayuda en la formación de micelas. Se prefieren tensioactivos con CMO en el intervalo micromolar; pueden utilizarse tensioactivos con CMC superiores para preparar micelas atrapadas dentro de liposomas de la presente divulgación.

[0231] Los liposomas según la presente divulgación pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4,235,871; la Solicitud PCT Publicada WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104; y Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Ámsterdam, 1993. Por ejemplo, pueden prepararse liposomas de la presente divulgación mediante difusión de un lípido derivatizado con un polímero hidrófilo en liposomas preformados, tal como exponiendo liposomas preformados a micelas compuestas por polímeros injertados con lípidos, a concentraciones de lípidos correspondientes al porcentaje molar final del lípido derivatizado que se desea en el liposoma. También pueden formarse liposomas que contienen un polímero hidrófilo mediante homogeneización, hidratación en campo de lípidos o técnicas de extrusión, tal como se conoce en la técnica.

[0232] En otro procedimiento de formulación a modo de ejemplo, el agente activo se dispersa en primer lugar mediante sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro

tensioactivo de baja CMC (incluyendo lípidos injertados con polímero) que solubilice fácilmente moléculas hidrófobas. La suspensión micelar resultante de agente activo se usa entonces para rehidratar una muestra lipídica secada que contiene un porcentaje en moles adecuado de lípido injertado con polímero, o colesterol. La suspensión de agente activo y lípido se forma entonces para dar liposomas usando técnicas de extrusión tal como se conocen en la técnica, y los liposomas resultantes se separaron de la disolución no encapsulada mediante separación en columna convencional.

[0233] En un aspecto de la presente divulgación, los liposomas se preparan para que tengan tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaño seleccionado. Un método de dimensionamiento eficaz implica extruir una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana se corresponderá aproximadamente con los tamaños más grandes de los liposomas producidos mediante extrusión a través de esa membrana. Véase por ejemplo la Patente de los Estados Unidos n.° 4,737,323 (12 de abril de 1988). En determinadas realizaciones, pueden utilizarse reactivos tales como DharmaFECT® y Lipofectamine® para introducir polinucleótidos o proteínas en células.

[0234] Las características de liberación de una formulación de la presente divulgación dependen del material de encapsulación, la concentración de fármaco encapsulado y la presencia de modificadores de la liberación. Por ejemplo, la liberación puede manipularse para que sea dependiente del pH, por ejemplo, usando un recubrimiento sensible al pH que libera solo a un bajo pH, como en el estómago, o un pH superior, como en el intestino. Puede usarse un recubrimiento entérico para impedir que se produzca la liberación hasta

después del paso a través del estómago. Pueden usarse múltiples recubrimientos o mezclas de cianamida encapsulada en diferentes materiales para obtener una liberación inicial en el estómago, seguido por liberación posterior en el intestino. La liberación puede manipularse también mediante inclusión de sales o agentes formadores de poros, que pueden aumentar la captación de agua o la liberación del fármaco mediante difusión a través de la cápsula. También pueden usarse excipientes que modifican la solubilidad del fármaco para controlar la velocidad de liberación. Pueden incorporarse también agentes que potencian la degradación de la matriz o la liberación de la matriz. Pueden añadirse al fármaco, añadirse como fases separadas (es decir, como materiales particulados), o pueden codisolverse en la fase de polímero dependiendo del compuesto. En la mayoría de los casos, la cantidad debe estar entre el 0.1 y el 30 por ciento (p/p de polímero). Los tipos de potenciadores de la 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®. Agentes formadores de poros que añaden microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua tales como azúcares y sales inorgánicas) se añaden como materiales particulados. El intervalo es normalmente de entre el uno y el treinta por ciento (p/p de polímero).

[0235] La captación también puede manipularse alterando el tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto puede lograrse, por ejemplo, recubriendo la partícula

con, o seleccionando como material de encapsulación, un polímero de adhesivo mucoso. Los ejemplos incluyen la mayoría de los polímeros con grupos carboxilo libres, tales como quitosano, celulosas y especialmente poliacrilatos (tal como se usa en el presente documento, poliacrilatos se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

[0236] Un conjugado de oligómero antisentido puede formularse para que esté contenido dentro de, o, adaptado para liberarse mediante un implante o dispositivo médico o quirúrgico. En determinados aspectos, un implante puede recubrirse o tratarse de otra forma con un conjugado de oligómero antisentido. Por ejemplo, pueden usarse hidrogeles, u otros polímeros, tales como polímeros biocompatibles y/o biodegradables, para recubrir un implante con las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación (es decir, la composición puede estar adaptada para su uso con un dispositivo médico usando un hidrogel u otro polímero). Se conocen bien en la técnica polímeros y copolímeros para recubrir dispositivos médicos con un agente. Los ejemplos de implantes incluyen, pero no se limitan a, endoprótesis, endoprótesis que eluyen fármacos, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéteres de diálisis, injertos vasculares, válvulas cardiacas protésicas, marcapasos cardiacos, desfibriladores cardioversores implantables, agujas IV, dispositivos para la formación y endurecimiento de huesos, tales como clavijas, tornillos, placas y otros dispositivos, y matrices tisulares artificiales para la cicatrización de heridas.

[0237] Además de los métodos proporcionados en el presente documento, los conjugados de oligómero antisentido para su uso de acuerdo con la divulgación pueden formularse para su administración de cualquier manera conveniente para

su uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros agentes farmacéuticos. Los conjugados de oligómero antisentido y sus correspondientes formulaciones pueden administrarse solos o en combinación con otras estrategias terapéuticas en el tratamiento de la distrofia muscular, tales como trasplante de mioblastos, terapias con células madre, administración de antibióticos aminoglucósidos, inhibidores del proteasoma y terapias de regulación positiva (por ejemplo, regulación positiva de utrofina, un parálogo autosómico de la distrofina).

[0238] En algunas realizaciones, el agente terapéutico adicional puede administrarse antes, de manera concurrente o después de la administración del conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación. Por ejemplo, los conjugados de oligómero antisentido pueden administrarse en combinación con un esteroide y/o antibiótico. En ciertas realizaciones, los conjugados de oligómero antisentido se administran a un paciente que está tomando una terapia de fondo con esteroides (por ejemplo, terapia con esteroides intermitente y/o crónica/continua de fondo). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el paciente se ha tratado con un corticosteroide antes de la administración de un oligómero antisentido y sigue recibiendo la terapia con esteroides. En algunas realizaciones, el esteroide es glucocorticoide o prednisona.

[0239] Las vías de administración descritas están previstas solo como orientación puesto que un experto en la técnica será capaz de determinar fácilmente la vía de administración óptima y cualquier dosificación para cualquier estado y animal particular. Se han intentado múltiples enfoques para introducir nuevo material genético funcional en células, tanto in vitro como in vivo (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). Estos enfoques incluyen la

integración del gen que va a expresarse en retrovirus modificados (Friedmann (1989) citado anteriormente; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S); integración en vectores distintos de 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 unido a un elemento de promotor-potenciador heterólogo por medio de liposomas (Friedmann (1989), citado anteriormente; 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 y Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855); acoplado a sistemas de transporte basados en cationes, específicos de ligando (Wu y Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) o el uso de ADN desnudo, vectores de expresión (Nabel et al. (1990), citado anteriormente; Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468). La inyección directa de transgenes en tejido produce solo expresión localizada (Rosenfeld (1992) citado anteriormente; Rosenfeld et al. (1991) citado anteriormente; Brigham et al. (1989) citado anteriormente; Nabel (1990) citado anteriormente; y Hazinski et al. (1991) citado anteriormente). El grupo de Brigham et al. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 y Clinical Research (1991) 39 (resumen)) han notificado la transfección in vivo solo de pulmones de ratones tras la administración intravenosa o intratraqueal de un complejo de ADN-liposoma. Un ejemplo de un artículo de revisión de procedimientos de terapia génica humana es: Anderson, Science (1992) 256:808-813.

[0240] En una realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender adicionalmente un hidrato de carbono tal como se proporciona en Han *et al.*, Nat. Comms. 7, 10981 (2016) la totalidad del

cual se incorpora en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender el 5% de un hidrato de carbono de hexosa. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la divulgación puede comprender el 5% de glucosa, el 5% de fructosa o el 5% de manosa. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender el 2.5% de glucosa y el 2.5% de fructosa. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender un hidrato de carbono seleccionado de: arabinosa presente en una cantidad del 5% en volumen, glucosa presente en una cantidad del 5% en volumen, sorbitol presente en una cantidad del 5% en volumen, galactosa presente en una cantidad del 5% en volumen, fructosa presente en una cantidad del 5% en volumen, xilitol presente en una cantidad del 5% en volumen, manosa presente en una cantidad del 5% en volumen, una combinación de glucosa y fructosa cada una presente en una cantidad del 2.5% en volumen y una combinación de glucosa presente en una cantidad del 5.7% en volumen, fructosa presente en una cantidad del 2.86% en volumen y xilitol presente en una cantidad del 1.4% en volumen.

IV. Métodos de uso

Restauración del marco de lectura de la distrofina usando omisión de exón

[0241] Un posible enfoque terapéutico para el tratamiento de DMD provocada por mutaciones fuera de marco en el gen de distrofina se sugiere por la forma más leve de distrofinopatía conocida como BMD, que está provocada por mutaciones en marco. La capacidad para convertir una mutación fuera de marco en una mutación en marco conservaría hipotéticamente el marco de lectura del ARNm y produciría una proteína distrofina funcional aunque acortada

internamente. Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación se diseñaron para lograr esto.

[0242] La hibridación del PMO con la secuencia de pre-ARNm seleccionada como diana interfiere con la formación del complejo de corte y empalme de pre-ARNm y elimina el exón 53 del ARNm maduro. La estructura y conformación de los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación permiten el emparejamiento de bases específico de secuencia con la secuencia complementaria. Mediante un mecanismo similar, eteplirsen, por ejemplo, que es un PMO que se diseñó para omitir el exón 51 del pre-ARNm de distrofina, permite el emparejamiento de bases específico de secuencia con la secuencia complementaria contenida en el exón 51 del pre-ARNm de distrofina.

[0243] El ARNm de distrofina normal que contiene los 79 exones producirá proteína distrofina normal. El gráfico en la Fig. 1 representa 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 ilustra cómo se dividen los codones entre exones; obsérvese que un codón consiste en tres nucleótidos. Los exones con forma rectangular comienzan y terminan con codones completos. Los exones con forma de flecha comienzan con un codón completo, pero terminan con un codón dividido, que contiene solo el nucleótido n.° 1 del codón. Los nucleótidos n.° 2 y n.° 3 de este codón están contenidos en el exón posterior, que comenzará con una forma de cheurón.

[0244] El ARNm de distrofina en el que faltan exones completos del gen de distrofina normalmente da como resultado DMD. La gráfica en la Fig. 2 ilustra un tipo de mutación genética (eliminación del exón 50) que se sabe que da como resultado DMD. Debido a 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 está desplazado, dando como resultado un marco de lectura de ARNm fuera de marco y la incorporación de aminoácidos incorrectos cadena abajo de la mutación. La posterior ausencia de un dominio de unión a distroglucano C-terminal funcional da como resultado la producción de una proteína distrofina inestable.

[0245] Eteplirsen omite el exón 51 para restaurar el marco de lectura del ARNm. Debido a que el exón 49 termina en un codón completo y el exón 52 comienza con el primer nucleótido de un codón, la eliminación del exón 51 restaura el marco de lectura, dando como resultado la producción de una proteína distrofina internamente acortada con un sitio de unión a distroglucano intacto, similar a una mutación de BMD "en marco" (Fig. 3).

[0246] La viabilidad de mejorar el fenotipo de DMD usando omisión de exón para restaurar el marco de lectura abierto del ARNm de distrofina está apoyada por investigación no clínica. Numerosos estudios en modelos animales distróficos de DMD han mostrado que la restauración de la distrofina por omisión de exón conduce a mejoras fiables en la función y fuerza musculares (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). Un ejemplo convincente de esto procede de un estudio en el que los niveles de distrofina tras la terapia de omisión de exón (usando un PMO) se compararon con la función muscular en el mismo tejido. En ratones mdx distróficos, los músculos tibiales anteriores (TA) tratados con un PMO específico de ratón se mantuvieron a ~75% de su capacidad de fuerza máxima tras contracciones que inducen estrés, mientras que los músculos TA contralaterales no tratados se mantuvieron solo a ~25% de su

capacidad de fuerza máxima ($p < 0.05$) (Sharp 2011). En otro estudio, 3 perros *CXMD* distróficos recibieron a los 2-5 meses de edad terapia de omisión de exón usando un PMO específico para su mutación genética una vez a la semana durante de 5 a 7 semanas o cada dos semanas durante 22 semanas. Tras la terapia de omisión de exón, los 3 perros demostraron una expresión extensa, por todo el cuerpo de distrofina en el músculo esquelético, así como ambulación mantenida o mejorada (prueba de carrera de 15 m) en relación con el nivel inicial. En cambio, perros *CXMD* de edad coincidente no tratados mostraron una disminución marcada en la ambulación a lo largo del transcurso del estudio (Yokota 2009).

[0247] Se mostró que los PMO tenían más actividad de omisión de exón a concentraciones equimolares que los fosforotioatos tanto en ratones mdx como en el modelo de ratón con DMD humanizado (hDMD), que expresa todo el transcrito de DMD humano (Heemskirk 2009). Los experimentos *in vitro* usando reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscripción (RT-PCR) y de transferencia de Western (WB) en células de músculo esquelético humano normales o células musculares de pacientes con DMD con diferentes mutaciones susceptibles a la omisión del exón 51 identificaron eteplirsen (un PMO) como un potente inductor de la omisión del exón 51. La omisión del exón 51 inducida por eteplirsen se ha confirmado *in vivo* en el modelo de ratón hDMD (Arechavala-Gomeza 2007).

[0248] Los resultados clínicos para analizar el efecto de un conjugado de oligómero antisentido que es complementario a una región diana del exón 53 del pre-ARNm de distrofina humano e induce la omisión del exón 53 incluyen el porcentaje de fibras positivas para distrofina (PDFP), la prueba de marcha de seis minutos (6MWT), la pérdida de ambulación (LOA), la evaluación ambulatoria de North Star

(NSAA), pruebas de función pulmonar (PFT), capacidad para levantarse (desde una posición supina) sin soporte externo, producción de distrofina *de novo* y otras mediciones funcionales.

[0249] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, la presente divulgación 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 53. La producción de proteína puede medirse mediante reacción en cadena de la polimerasa de retrotranscripción (RT-PCR), análisis de transferencia de Western o inmunohistoquímica (IHC).

[0250] En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para tratar la DMD en un sujeto que lo necesite, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en el presente documento. En diversas realizaciones, el tratamiento del sujeto se mide mediante el retraso en la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones, el tratamiento del sujeto se mide mediante el mantenimiento de la ambulación en el sujeto o la pérdida de ambulación en el sujeto. En algunas realizaciones, la ambulación se mide

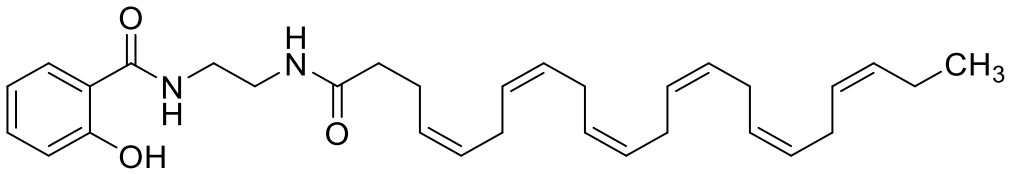
usando la prueba de marcha de 6 minutos (6MWT). En ciertas realizaciones, la ambulación se mide usando la evaluación ambulatoria de North Star (NSAA).

[0251] En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para mantener la función pulmonar o reducir la pérdida de función pulmonar en un sujeto con DMD, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de DMD que es susceptible a la omisión del exón 53, comprendiendo el método administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la función pulmonar se mide como la presión expiratoria máxima (MEP). En ciertas realizaciones, la función pulmonar se mide como la presión inspiratoria máxima (MIP). En algunas realizaciones, la función pulmonar se mide como la capacidad vital forzada (FVC).

[0252] En una realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden coadministrarse con un carbohidrato en los métodos de la divulgación, ya sea en la misma formulación o en una formulación separada, como se proporciona en Han *et al.*, Nat. Comms. 7, 10981 (2016) la totalidad del cual se incorpora en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden coadministrarse con un 5% de un carbohidrato de hexosa. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden coadministrarse con glucosa al 5%, fructosa al 5% o manosa al 5%. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden coadministrarse con glucosa al 2.5% y fructosa al 2.5%. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la divulgación puede coadministrarse con un carbohidrato seleccionado entre:

arabinosa presente en una cantidad del 5% en volumen, glucosa presente en una cantidad del 5% en volumen, sorbitol presente en una cantidad del 5% en volumen, galactosa presente en una cantidad del 5% en volumen, fructosa presente en una cantidad del 5% en volumen, xilitol presente en una cantidad del 5% en volumen, manosa presente en una cantidad del 5% en volumen, una combinación de glucosa y fructosa cada una presente en una cantidad del 2.5% en volumen y una combinación de glucosa presente en una cantidad del 5.7% en volumen, fructosa presente en una cantidad del 2.86% en volumen y xilitol presente en una cantidad del 1.4% en volumen.

[0253] En diversas realizaciones, un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación se coadministra con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antiinflamatorio no esteroideo. En algunas realizaciones, el compuesto antiinflamatorio no esteroideo es un inhibidor de NF-kB. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el inhibidor de NF-kB puede ser CAT-1004 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En diversas realizaciones, el inhibidor de NF-kB puede ser un conjugado de salicilato y DHA. En algunas realizaciones, el inhibidor de NF-kB es CAT-1041 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En ciertas realizaciones, el inhibidor de NF-kB es un conjugado de salicilato y EPA. En diversas realizaciones, el inhibidor de NF-kB es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

[0254] En algunas realizaciones, el compuesto antiinflamatorio no esteroideo es un inhibidor de TGF-b. Por

ejemplo, en ciertas realizaciones, el inhibidor de TGF-b es HT-100.

[0255] En ciertas realizaciones, se describe un conjugado de oligómero antisentido como se describe en el presente documento para su uso en terapia. En ciertas realizaciones, se describe un conjugado de oligómero antisentido como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. En ciertas realizaciones, se describe un conjugado de oligómero antisentido como se describe en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia. En ciertas realizaciones, se describe un conjugado de oligómero antisentido como se describe en el presente documento para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

V. <u>Kits</u>

[0256] La divulgación también proporciona kits para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética, comprendiendo dicho kit al menos una molécula antisentido (por ejemplo, un conjugado de oligómero antisentido que comprende el oligómero antisentido expuesto en la SEQ ID NO: 1), envasado en un recipiente adecuado, junto con instrucciones para su uso. Los kits pueden contener también reactivos periféricos tales como tampones, estabilizadores, etc. Los expertos habituales en el campo deben apreciar que las aplicaciones del método anterior tienen una amplia aplicación para identificar moléculas antisentido adecuadas para su uso en el tratamiento de muchas otras enfermedades. En una realización, el kit comprende un conjugado de oligómero antisentido de acuerdo con la fórmula (III).

Ejemplos

[0257] Aunque la divulgación anterior se ha descrito con cierto grado de detalle a modo ilustrativo y de ejemplo por motivos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto habitual en la materia a la vista de las enseñanzas en la presente divulgación que pueden efectuarse ciertos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente a modo ilustrativo y no de modo limitante. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para proporcionar resultados esencialmente similares.

Materiales y métodos

Células y condiciones de tratamiento de cultivo tisular

[0258] Se utilizaron miocitos humanos diferenciados (ZenBio, Inc.) para medir la omisión de exones. Específicamente, se cultivaron mioblastos (ZenBio, Inc., SKB-F) hasta una confluencia del 80-90% a 37 ^{0}C y un 5% de CO_2 en medio de crecimiento (SKB-M; ZenBio, Inc.). La diferenciación se inició reemplazando el medio de crecimiento con medio de diferenciación (SKM-D; ZenBio, Inc.). Para ensayar la omisión del exón 53, se emplacaron $1x10^4$ células diferenciadas en una placa de 24 pocillos y se añadió a cada pocillo 1 ml de medio de diferenciación (SKM-D; ZenBio, Inc.) que contenía diversas concentraciones de PMO o PPMO y se incubó durante 96 horas.

Análisis de transferencia de Western

[0259] Para el análisis por transferencia de Western, se homogeneizó el tejido con tampón de homogeneización (SDS al 4%, urea 4 M, tris-HCl 125 mM (pH 6.8)) a una relación de 9 a 18 secciones de tejido x 20-µm a aproximadamente 5 mm de

diámetro en 133 µl de tampón. El lisado correspondiente se recogió y sometió a cuantificación de proteínas usando el kit de ensayo de proteínas RC DC según las instrucciones del fabricante (BioRad, n.° de cat. 500-0122). Las muestras de extracto de tejido se diluyeron a 1:10 usando tampón de homogeneización para que se encontrasen dentro del intervalo de la curva patrón de BSA. Las muestras se prepararon de tal forma que 35 µl de muestra contenían la cantidad deseada de proteína usando 25 µl de lisado de proteína, 7 µl de tampón de muestra NuPAGE LDS (Life Technologies, n.° de cat. NP0008, Carlsbad, California, EE. UU.), y 3 µl de agente reductor NuPAGE (10x) (Life Technologies n.° de cat. NP0004). Tras calentar las muestras de proteína durante 5 minutos a 95 ^{0}C, se centrifugaron las muestras y el sobrenadante se cargó en un gel de tris-acetato de poliacrilamida al 3-8% NuPAGE Novex mini de 10 pocillos, 1 mm (Life Technologies n.° de cat. EA0375) a un máximo de 50 µg de carga total de proteína por carril. El gel se corrió a 150 voltios a temperatura ambiente hasta que el frente de tinte corrió fuera del gel. Los geles de proteína resultantes se transfirieron a membranas de PVDF (Life Technologies, n.° de cat. LC2007) durante 75 minutos a temperatura ambiente a 30 voltios usando tampón de transferencia NuPAGE (Life Technologies NP006-1), metanol al 10% y antioxidante NuPAGE al 0.1% (Life Technologies NP0005).

[0260] Después de la transferencia de proteína, se sumergieron las membranas de PVDF en tampón TTBS (TBS 1X (Amresco, n.° de cat. J640-4L), Tween-20 al 0.1% (v/v)). Las membranas se transfirieron a tampón de bloqueo (leche deshidratada desgrasada al 5% (p/v) (Lab Scientific, n.° de cat. M0841) en TTBS) y se empaparon durante una noche a 4 ^{0}C con agitación suave. Después de bloquear, las membranas se incubaron durante o bien 60 minutos a temperatura ambiente en DYS1 (Leica, n.° de cat. NCL-DYS1) diluido a 1:20 usando

tampón de bloqueo o 20 minutos en anticuerpo anti-α-actinina (Sigma-Aldrich n.° de cat. NA931V) diluido a 1:100,000 con tampón de bloqueo, seguido de seis lavados (cinco minutos cada uno con TTBS). La IgG anti-ratón conjugada a peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare, n.° de cat. NA931V) se diluyó a 1:40,000 usando tampón de bloqueo y se añadió a las membranas durante 45 minutos (DYS1) o 15 minutos (α-actinina), seguido nuevamente de seis lavados. Usando el kit de detección de Western ECL Prime (GE Healthcare n.° de cat. RPN2232), la película se expuso al gel y se reveló correspondientemente. La película revelada se escaneó y analizó usando el programa informático ImageQuant TL Plus (versión 8.1) y se llevó a cabo un análisis de regresión lineal usando el programa informático Graphpad.

[0261] Cada gel de transferencia de Western incluye una curva patrón de distrofina de 4 o 5 puntos preparada usando la proteína total extraída de tejido normal (cuádriceps, diafragma o corazón de ratón) diluida, por ejemplo, al 64%, 16%, 4%, 1% y 0.25% (véanse, por ejemplo, las figuras 5A y 5B) y se puntearon en extracto de tejido de DMD (por ejemplo, cuádriceps, diafragma o corazón de ratón mdx o cuádriceps, diafragma o músculo liso (GI)). Las muestras de curva patrón se procesaron como se ha descrito anteriormente. Se determinaron los niveles de proteína distrofina como el porcentaje de los niveles de distrofina de tipo silvestre (% en peso) comparando las intensidades de la banda de distrofina con la curva patrón del gel.

Análisis por RT-PCR

[0262] Para el análisis por RT-PCR, se aisló el ARN de las células usando el kit de centrifugación Illustra GE siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se determinó usando un instrumento NanoDrop. La omisión del exón 53 se midió mediante RT-PCR con un

cebador directo que se une a la unión del exón 51/52 y 54, SEQ ID NO: 5 (5'- CATCAAGCAGAAGGCAACAA-3') y un cebador inverso que se une a la unión del exón 51/52 y 54, SEQ ID NO: 6 (5'- GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3'). Un exón 53 omitido dio como resultado un amplicón de 201 pb y un exón 53 no omitido dio como resultado un amplicón con 413 pb.

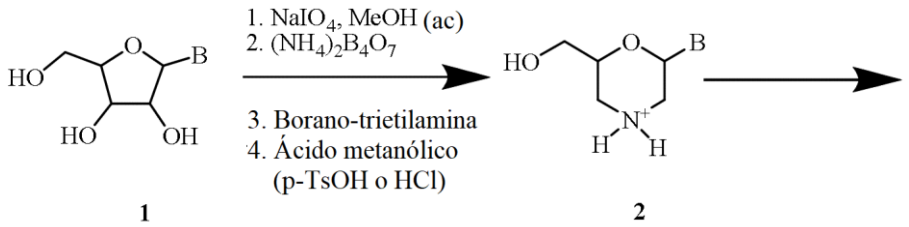
[0263] La omisión del exón 23 se midió mediante RT-PCR con un cebador directo, SEQ ID NO: 7 (5'- CACATCTTTGATGGTGTGAGG-3') y un cebador inverso, SEQ ID NO: 8 (5'- CAACTTCAGCCATCCATTTCTG -3').

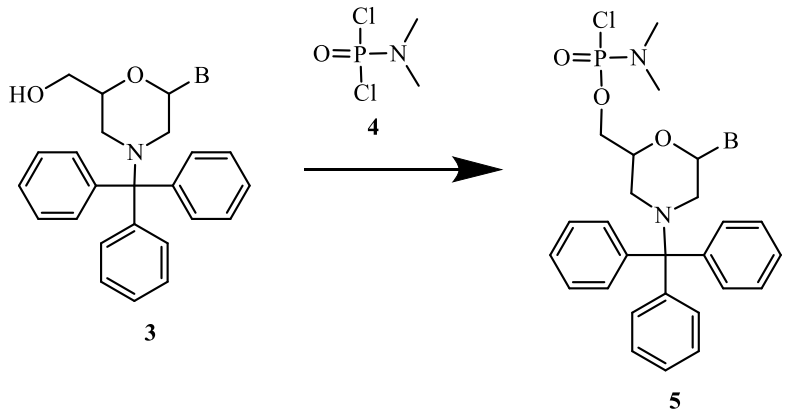
[0264] Después de someter el ARN a RT-PCR, se analizaron las muestras usando una máquina Caliper, que usa electroforesis capilar en gel. Se calculó el porcentaje de omisión del exón usando la siguiente ecuación: (área bajo la curva para bandas omitidas)/(suma del área bajo la curva para las bandas omitidas y no omitidas)x100.

Inmunohistoquímica: tinción de distrofina:

[0265] Se usaron secciones de tejido congeladas de 10 micrómetros del cuádriceps de ratón para detectar distrofina mediante el anticuerpo primario para distrofina (dilución 1:250, conejo, Abcam, n.° de cat. ab15277) en suero de cabra al 10% + BSA al 1% en PBS y anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con Alexa-Fluor 488 (dilución 1:1000) en suero de cabra al 10% + BSA al 1%.

Preparación de subunidades de morfolino





Esquema 1: Ruta sintética general para subunidades de PMO

[0266] En referencia al esquema 1, en donde B representa un resto de emparejamiento de bases, las subunidades de morfolino pueden prepararse a partir del ribonucleósido (**1**) correspondiente como se muestra. La subunidad de morfolino (**2**) puede protegerse opcionalmente mediante reacción con un precursor de grupo protector adecuado, por ejemplo, cloruro de tritilo. Generalmente, el grupo protector 3' se retira durante la síntesis del oligómero en estado sólido, como se describe en más detalle más adelante. De manera adecuada, el resto de emparejamiento de bases puede protegerse para la síntesis del oligómero en fase sólida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoílo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina y pivaloilmetilo para hipoxantina (I). El grupo pivaloiloximetilo puede introducirse en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina. Aunque puede emplearse 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 divulgados en la Patente de los Estados Unidos n.° 8,076,476, que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad.

[0267] La reacción de **3** con el compuesto de fósforo activado **4** da como resultado subunidades de morfolino que tienen el resto de enlace deseado **5**.

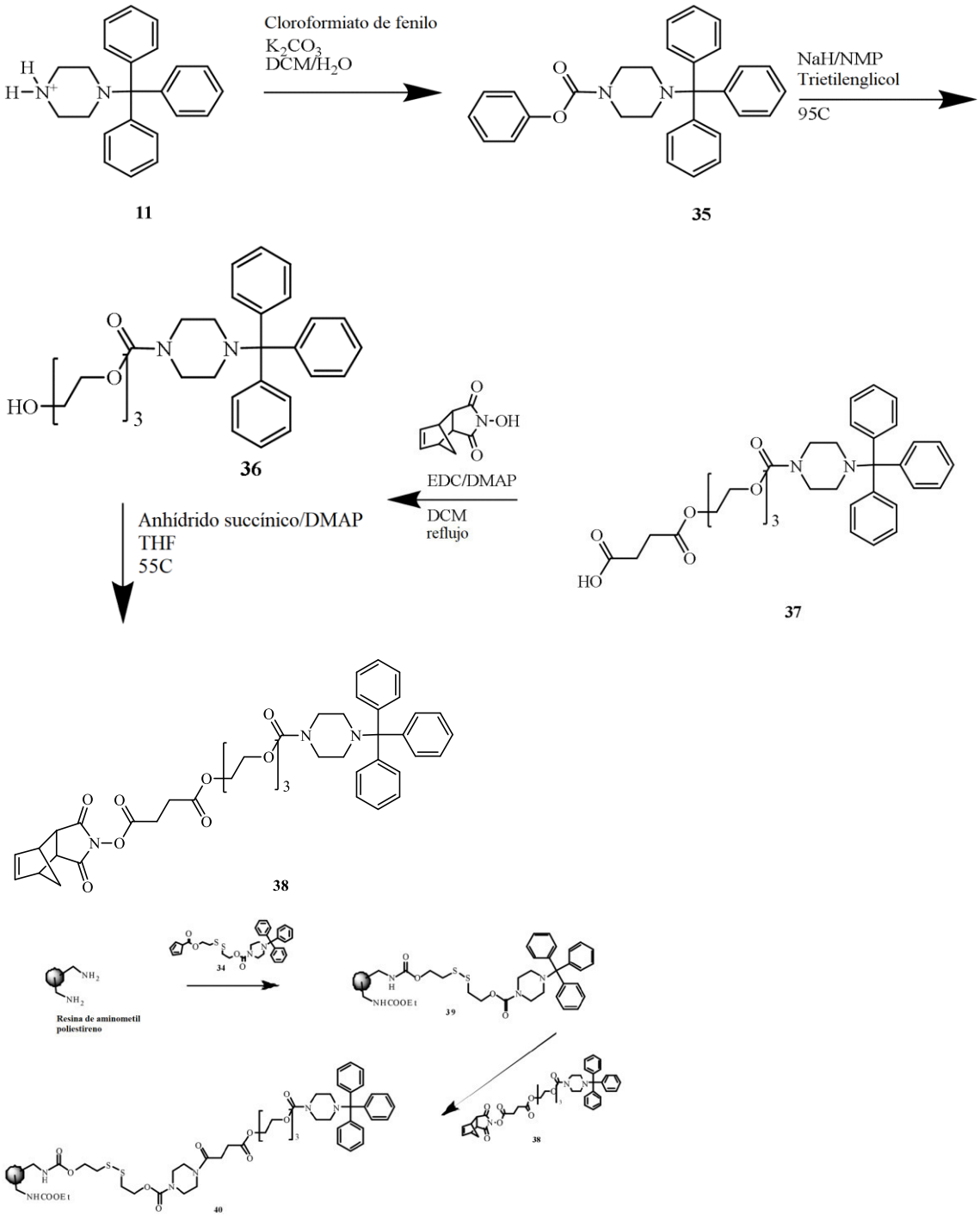
[0268] Los compuestos de estructura **4** pueden prepararse usando cualquier número de métodos conocidos por los expertos en la materia. El acoplamiento con el resto de morfolino se produce entonces como se ha indicado anteriormente.

[0269] Los compuestos de estructura **5** pueden usarse en la síntesis de oligómero en fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces entre subunidades. Dichos métodos se conocen bien en la técnica. Brevemente, puede modificarse un compuesto de estructura **5** en el extremo 5' para que contenga un enlazador a un soporte sólido. Una vez soportado, el grupo protector de **5** (por ejemplo, tritilo en el extremo 3') se retira y se hace reaccionar la amina libre con un resto de fósforo activado de un segundo compuesto de estructura **5**. Esta secuencia se repite hasta que se obtiene el oligo de longitud deseada. El grupo protector en el terminal 3' puede o bien retirarse o dejarse donde está en caso de que se desee una modificación 3'. El oligo puede retirarse del soporte sólido usando cualquier número de métodos o el tratamiento de ejemplo con una base para escindir el enlace al soporte sólido.

[0270] La preparación de oligómeros de morfolino en general y de oligómeros de morfolino específicos de la divulgación se describen con más detalle en los ejemplos.

Preparación de oligómeros de morfolino

[0271] La preparación de los compuestos de la divulgación se lleva a cabo usando el siguiente protocolo de acuerdo con el esquema 2:



Esquema 2: Preparación de ácido de cola activado

[0272] Preparación del fenil carbamato de piperazina **35**: A una suspensión enfriada del compuesto **11** en diclorometano (6 ml/g **11**) se le añadió una solución de carbonato de potasio (3.2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato de potasio). A esta mezcla bifásica, se le 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. Tras completarse la reacción (1-2 h), se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto **35** se aisló mediante cristalización a partir de acetonitrilo.

[0273] 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 le añadió trietilenglicol (10.0 eq) y compuesto **35** (1.0 eq). La suspensión resultante se calentó a 95 °C. Tras completarse la reacción (1-2 h), se enfrió la mezcla a 20 °C. A esta mezcla se le añadió diclorometano al 30%/metil terc-butil éter (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía producto se lavó sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso y cloruro de sodio acuoso saturado. El producto 36 se aisló mediante cristalización a partir de diclorometano/metil terc-butil éter/heptano.

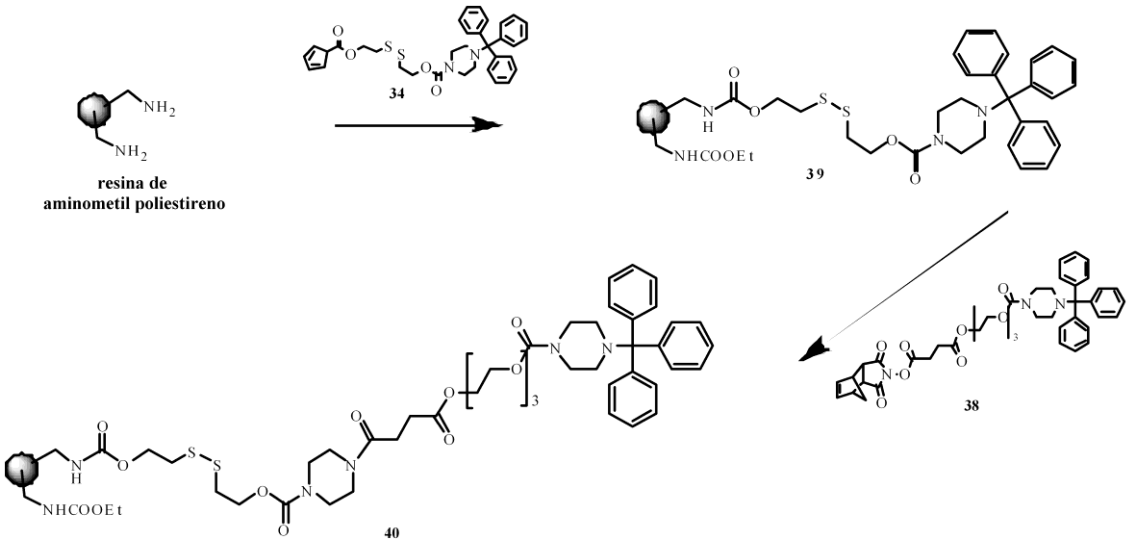
[0274] Preparación de ácido de cola **37:** A una solución de compuesto **36** en tetrahidrofurano (7 ml/g de **36**) se le añadió anhídrido succínico (2.0 eq) y DMAP (0.5 eq). La mezcla se calentó a 50 °C. Tras completarse la reacción (5 h), la mezcla se enfrió a 20 °C y se ajustó a pH 8.5 con NaHCO3 acuoso. Se añadió metil terc-butil éter y el producto se extrajo en la capa acuosa. Se añadió diclorometano y la mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contenía producto se lavó con una mezcla de tampón citrato a pH = 3 y cloruro de sodio acuoso saturado. Esta solución en diclorometano de **37** se usó sin aislamiento en la preparación del compuesto **38.**

[0275] Preparación de **38:** A la solución de compuesto **37** se le añadió imida del ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1.02 eq), 4-dimetilaminopiridina

(DMAP) (0.34 eq) y después clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1.1 eq). La mezcla se calentó a 55 °C. Tras completarse 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 en diclorometano se sometió a intercambio de disolvente a acetona y después 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 en bruto se resuspendió varias veces en agua para retirar la N,N-dimetilformamida residual y las sales.

Método A de síntesis de PMO: Uso de anclaje de disulfuro

[0276] La introducción de la "cola" activada en la resina cargada de anclaje se llevó a cabo en dimetil imidazolidinona (DMI) mediante el procedimiento usado para la incorporación de las subunidades durante la síntesis en fase sólida.



Esquema 3: Preparación del soporte en fase sólida para la síntesis de oligómeros de morfolino

[0277] Este procedimiento se llevó a cabo en un vial para péptidos silanizado con camisa (ChemGlass, NJ, EE. UU.)

con una frita de vidrio de porosidad gruesa (40-60 µm) agitador superior y llave de cierre de Teflón de 3 vías para permitir el burbujeo de N2 hacia arriba a través de la frita o una extracción de vacío.

[0278] Las etapas de tratamiento con resina/lavado en el siguiente procedimiento consisten en dos operaciones básicas: fluidización de la resina o reactor de lecho de agitación y extracción de disolvente/solución. Para la fluidización de la resina, se posicionó la llave de cierre para permitir el flujo de N2 a través de la frita y se añadió el tratamiento de resina/lavado especificado al reactor y se dejó permear y humectar completamente la resina. Después, se comenzó el mezclado y la suspensión de resina se mezcló durante el tiempo especificado. Para la extracción del disolvente/solución, se detuvieron el mezclado y el flujo de N2 y se accionó la bomba de vacío y después se posicionó la llave de cierre para permitir la evacuación del tratamiento de resina/lavado a los desechos. Todos los volúmenes de tratamiento de resina/lavado fueron de 15 ml/g de resina a menos que se indique otra cosa.

[0279] Se añadió a la resina de aminometilpoliestireno (malla 100-200; ~1.0 mmol/g de carga basándose en la sustitución de nitrógeno; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, R. U., n.° de pieza 1464-X799) en un vial para péptido silanizado con camisa 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y se dejó que la resina se hinchase con mezclado durante 1-2 h. Después de la evacuación del disolvente de hinchado, se lavó la resina con diclorometano (2 x 1-2 min), diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Tras la evacuación del lavado final, se trató la resina 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. Tras completarse la reacción, se interrumpió el calentamiento y se evacuó la solución de anclaje 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 al 10% (v/v) de dicarbonato de dietilo en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 min) y después se lavó con diclorometano (6 x 1-2 min). La resina **39** se secó en una corriente de N2 durante 1-3 h y después al vacío hasta peso constante (± 2%). Rendimiento: 110-150% del peso original de la resina.

[0280] Determinación de la carga de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro: La carga de la resina (número de sitios reactivos potencialmente disponibles) se determina mediante un ensayo espectrométrico para el número de grupos trifenilmetilo (tritilo) por gramo de resina.

[0281] Se transfiere un peso conocido de resina seca (25 ± 3 mg) a un matraz volumétrico silanizado de 25 ml y se añaden ~5 ml de ácido trifluoroacético al 2% (v/v) en diclorometano. Los contenidos se mezclaron removiendo suavemente y después se dejaron reposar durante 30 min. El volumen se enrasa hasta 25 ml con ácido trifluoroacético al 2% (v/v) adicional en diclorometano y se mezclan exhaustivamente los contenidos. Usando una pipeta de desplazamiento positivo, se transfiere una alícuota de la solución que contiene tritilo (500 µl) a un matraz volumétrico de 10 ml y se enrasa el volumen hasta 10 ml con ácido metanosulfónico.

[0282] El contenido de catión tritilo en la solución final se mide mediante la absorbancia UV a 431.7 nm y se calcula la carga de la resina en grupos tritilo por gramo de resina (µmol/g) usando los volúmenes, diluciones, coeficientes de extinción (ε: 41 µmol-1cm-1) y peso de la

resina adecuados. El ensayo se lleva a cabo por triplicado y se calcula una carga media.

[0283] El procedimiento de carga de la resina en este ejemplo proporcionará resina con una carga de aproximadamente 500 µmol/g. Se obtuvo una carga de 300-400 en µmol/g en caso de llevar a cabo la etapa de incorporación de anclaje de disulfuro durante 24 h a temperatura ambiente.

[0284] Carga de cola: Usando la misma configuración y volúmenes que para la preparación de la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro, puede introducirse la cola en el soporte sólido. En primer lugar, la resina cargada con anclaje se desprotegió en condiciones ácidas y el material resultante se neutralizó antes del acoplamiento. Para la etapa de acoplamiento, se usó 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 h a 45 °C, se lavó dos veces la resina **39** con diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano y una vez con DCM. A la resina se le añadió una solución de anhídrido benzoico (0.4 M) y NEM (0.4 M). Después de 25 min, se enfrió la camisa del reactor a temperatura ambiente y la resina se lavó dos veces con diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano y ocho veces con DCM. La resina **40** se filtró y se secó a alto vacío. La carga para la resina **40** se define como la carga para la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro **39** original usada en la carga de la cola.

[0285] Síntesis de fase sólida: Los oligómeros de morfolino se prepararon en un sintetizador de péptidos automatizado Gilson AMS-422 en columnas de reacción de polipropileno Gilson de 2 ml (pieza n.° 3980270). Se colocó un bloque de aluminio con canales para el flujo de agua alrededor de la columna a medida que reposaban sobre el

sintetizador. El dispositivo AMS-422 añadirá alternativamente soluciones de reactivo/lavado, retendrá durante un tiempo especificado y evacuará las columnas usando vacío.

[0286] Para oligómeros en el intervalo de hasta aproximadamente 25 subunidades de longitud, se prefiere una resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con una carga próxima a 500 µmol/g de resina. Para oligómeros de mayor tamaño, se refiere una resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con una carga de 300-400 µmol/g de resina. En caso de que se desee una molécula con cola 5', se selecciona una resina que se haya cargado con cola con las mismas guías de carga.

[0287] Se prepararon las siguientes soluciones de reactivo:

Solución de destritilación: Ácido cianoacético al 10% (p/v) en diclorometano/acetonitrilo 4:1;

Solución de neutralización: Diisopropiletilamina al 5% en diclorometano/isopropanol 3:1; y

Solución de acoplamiento: subunidad de morfolino activada 0.18 M (o 0.24 M para oligómeros que tienen más de 20 subunidades) de la base deseada y el tipo de enlace deseado y N-etilmorfolina 0.4 M, en 1,3-dimetilimidazolidinona.

[0288] Se usó diclorometano (DCM) como lavado transicional que separa los diferentes lavados de solución de reacción.

[0289] En el sintetizador, con el bloque configurado a 42 °C, a cada columna que contenía 30 mg de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (o resina de cola) se le añadieron 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de lavar 2

veces con 2 ml de diclorometano, se empleó el siguiente ciclo de síntesis:

Etapa	Volumen	Suministro	Tiempo de retención
Destritilación	1.5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1.5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1.5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1.5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1.5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	1.5 ml	Colector	15 segundos
Destritilación	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
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
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
DCM	1.5 ml	Colector	30 segundos

[0290] Se programaron las secuencias de los oligómeros individuales en el sintetizador, de tal forma que cada columna recibe la solución de acoplamiento adecuada (A,C,G,T,I) en la secuencia adecuada. Cuando el oligómero en una columna había completado la incorporación de su subunidad final, se retiró la columna del bloque y se llevó a cabo manualmente un ciclo final con una solución de acoplamiento

formada por cloruro de 4-metoxifenilmetilo (0.32 M en DMI) que contenía 4-etilmorfolina 0.89 M.

[0291] Escisión de la resina y retirada de bases y grupos protectores de la cadena principal: Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Se añadió 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, se tapó la columna y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido este tiempo, se drenó la solución 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 le añadieron 4.0 ml de amoniaco acuoso concentrado (almacenado a -20 °C), el vial se tapó herméticamente (con un tapón de rosca revestido de Teflón) y la removió la mezcla para mezclar la solución. El vial se colocó en un horno a 45 °C durante 16-24 h para llevar a cabo la escisión de la base y de los grupos protectores de la cadena principal.

[0292] Purificación del producto en bruto: Se retiró la solución de amoniolisis en el vial del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se diluyó con 20 ml de amoniaco acuoso al 0.28% y se hizo pasar a través de una columna de 2.5x10 cm que contenía resina Macroprep HQ (BioRad). Un gradiente salino (A: amoniaco al 0.28% con B: cloruro de sodio 1 M en amoniaco al 0.28%; B al 0-100% en 60 min) se usó para eluir el pico que contenía metoxitritilo. Las fracciones combinadas se reunieron y procesaron adicionalmente dependiendo del producto deseado.

[0293] Desmetoxitritilación de los oligómeros de morfolino: Las fracciones reunidas de la purificación con Macroprep se trataron con H_3PO_4 1 M para reducir el pH a 2.5. Después del mezclado inicial, se dejaron reposar las muestras a temperatura ambiente durante 4 min, tiempo tras el cual se

han neutralizado a pH 10-11 con amoniaco/agua al 2.8%/agua. Los productos se purificaron mediante extracción en fase sólida (SPE).

[0294] Empaquetado y acondicionado de la columna de SPE: Se empaquetó Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 ml) en columnas fritadas de 20 ml (Columnas de cromatografía BioRad Econo-Pac (732-1011)) y la resina se enjuagó con 3 ml de lo siguiente: NH_4OH al 0.28% / acetonitrilo al 80%; NaOH 0.5 M / etanol al 20%; agua; H_3PO_4 50 mM / acetonitrilo al 80%; agua; NaOH 0.5 M/ etanol al 20%; agua; NH_4OH al 0.28%.

[0295] Purificación por SPE: La solución de la desmetoxitritilación se cargó en la columna y se enjuagó la resina tres veces con 3-6 ml de amoniaco acuoso al 0.28%. Se colocó un vial Wheaton (12 ml) bajo la columna y el producto se eluyó mediante dos lavados con 2 ml de acetonitrilo al 45% en amoniaco acuoso al 0.28%.

[0296] Aislamiento del producto: Las soluciones se congelaron en nieve carbónica y se colocaron los viales en un liofilizador para producir un polvo blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en agua, se filtraron a través de un filtro de 0.22 micrómetros (Pall Life Sciences, filtro de jeringa Acrodisc de 25 mm, con una membrana HT Turrfyn de 0.2 micrómetros) usando una jeringa y se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro UV para determinar las unidades de DO de oligómero presente, así como dispensar la muestra para su análisis. Después, se colocaron las muestras en viales Wheaton negros para su liofilización.

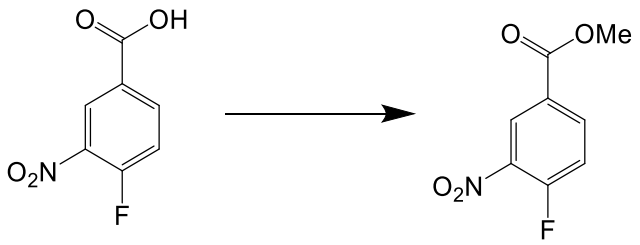
[0297] Análisis de los oligómeros de morfolino mediante MALDI: Se usó espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar la composición de fracciones en las purificaciones así como para proporcionar pruebas de identidad (peso molecular) de los oligómeros. Las muestras

se ejecutaron después de la dilución con solución de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinnámico (ácido sinapínico), 3,4,5-trihidroxiacetofenona (THAP) o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinnámico (HCCA) en forma de matrices.

[0298] Método B de síntesis de PMO: Uso de anclaje de NCP2

Síntesis de anclaje de NCP2:

1. Preparación de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (**1**)

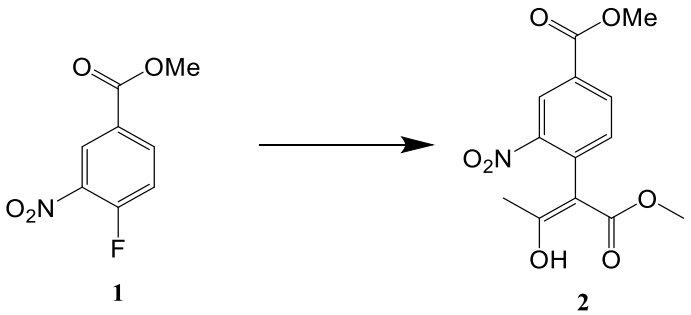


1

[0299] A un matraz de 100 l cargado con 12.7 kg de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico se le añadieron 40 kg de metanol y 2.82 kg de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó a reflujo (65 °C) durante 36 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se formaron cristales a 38 °C. La mezcla se mantuvo a 0° C durante 4 h, después se filtró en atmósfera de nitrógeno. El matraz de 100 l se lavó y la torta de filtro se lavó con 10 kg de metanol que se había enfriado a 0 °C. La torta de filtro sólida se secó en el embudo durante 1 hora, se transfirió a bandejas y se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante de 13.695 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (rendimiento del 100%; 99% por HPLC).

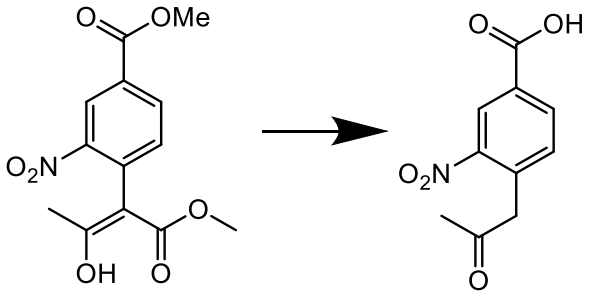
2. Preparación de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico

A. 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metilo (**2**)



[0300] En un matraz de 100 l se cargaron 3.98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (**1**) de la etapa anterior, 9.8 kg de DMF y 2.81 kg de acetoacetato de metilo. La mezcla se agitó y enfrió a 0 °C. A esto se le añadieron 3.66 kg de DBU a lo largo de aproximadamente 4 horas mientras se mantenía la temperatura a o por debajo de 5 °C. La mezcla se agitó durante 1 hora adicional. Al matraz de reacción se le añadió una solución de 8.15 kg de ácido cítrico en 37.5 kg de agua purificada mientras que la temperatura de reacción se mantenía a o por debajo de 15 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos adicionales y después se filtró en atmósfera de nitrógeno. La torta de filtro húmeda se devolvió al matraz de 100 l junto con 14.8 kg de agua purificada. La suspensión se agitó durante 10 minutos y después se filtró. De nuevo, se devolvió la torta húmeda al matraz de 100 l, se suspendió con 14.8 kg de agua purificada durante 10 minutos y se filtró para dar 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metilo.

B. Ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico

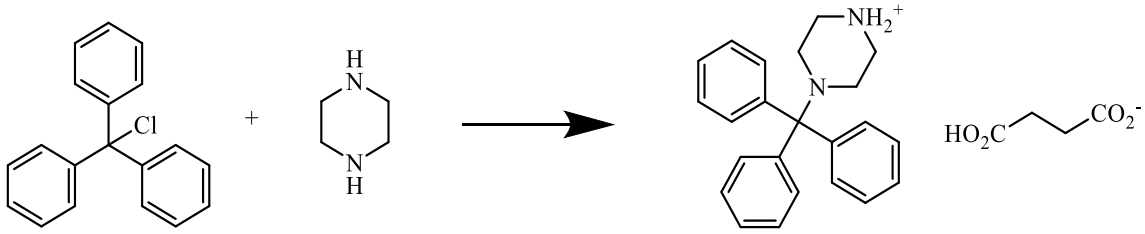


2 **3**

[0301] Se cargó el 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metilo en un matraz de reacción de 100 l en atmósfera de nitrógeno. A esto se le añadieron 14.2 kg de 1,4-dioxano y después se agitó. A la mezcla se le añadió una mezcla de 16.655 kg de HCl concentrado y 13.33 kg de agua purificada (HCl 6 M) a lo largo de 2 horas mientras se mantenía la temperatura de la mezcla de reacción por debajo de 15 °C. Cuando se completó la adición, se calentó a reflujo la mezcla de reacción (80 °C) durante 24 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente y se filtró en atmósfera de nitrógeno. La torta de filtro sólida se trituró con 14.8 kg de agua purificada, se filtró, se trituró nuevamente con 14.8 kg de agua purificada y se filtró. Se devolvió el sólido al matraz de 100 l con 39.9 kg de DCM y se sometió a reflujo con agitación durante 1 hora. Se añadieron 1.5 kg de agua purificada para disolver los sólidos restantes. La capa orgánica del fondo se separó a un matraz de 72 l precalentado, después se devolvió a un matraz limpio seco de 100 l. La solución se enfrió a 0 °C, se retuvo durante 1 hora y después se filtró. La torta de filtro sólida se lavó dos veces cada vez con una solución de 9.8 kg de DCM y 5 kg de heptano y después se enfrió en el embudo. El sólido se transfirió a bandejas y se secó hasta un peso constante de 1.855 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico.

Rendimiento general del 42% a partir del compuesto **1.** 99.45% mediante HPLC.

3. Preparación de succinato de N-tritilpiperazina (NTP)



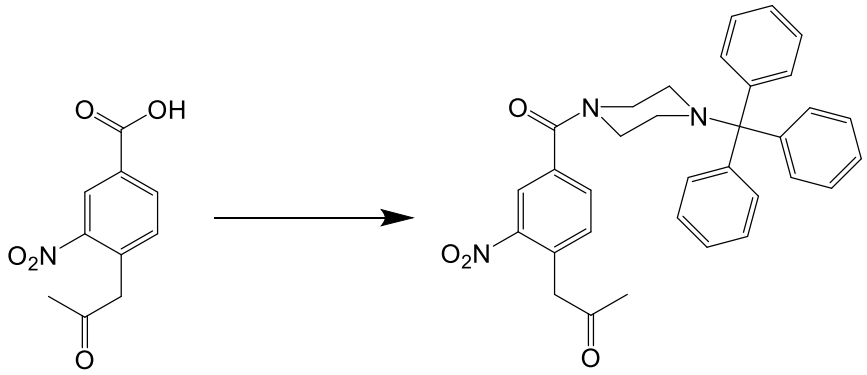
[0302] En un matraz de 72 l con camisa se cargaron en atmósfera de nitrógeno 1.805 kg de cloruro de trifenilmetilo y 8.3 kg de tolueno (solución de TPC). La mezcla se agitó hasta que se disolvieron los sólidos. En un matraz de reacción de 100 l con camisa se añadieron en atmósfera de nitrógeno 5.61 kg de piperazina, 19.9 kg de tolueno y 3.72 kg de metanol. La mezcla se agitó y enfrió a 0 °C. A esto se le añadió lentamente en porciones la solución de TPC a lo largo de 4 horas mientras que la temperatura de reacción se mantuvo a o por debajo de 10 °C. La mezcla se agitó durante 1.5 horas a 10 °C, después se dejó calentar a 14° C. Se cargaron 32.6 kg de agua purificada al matraz de 72 L, después se transfirieron al matraz de 100 L mientras que la temperatura interna del lote se mantuvo a 20 +/- 5 °C. Se dejaron separar las capas y se separó y almacenó la fase acuosa inferior. La capa orgánica se extrajo tres veces con 32 kg de agua purificada cada vez y se separaron las capas acuosas y se combinaron con la solución acuosa almacenada.

[0303] La capa orgánica restante se enfrió a 18 °C y se añadió lentamente en porciones a la capa orgánica una solución de 847 g de ácido succínico en 10.87 kg de agua purificada. La mezcla se agitó durante 1.75 horas a 20 +/- 5 °C. La mezcla se filtró y los sólidos se lavaron con 2 kg de TBME y 2 kg de acetona y después se secó en el embudo. La

torta de filtro se trituró dos veces con 5.7 kg cada vez de acetona y se filtró y se lavó con 1 kg de acetona entre las trituraciones. El sólido se secó en el embudo, después se transfirió a bandejas y se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante de 2.32 kg de NTP. Rendimiento del 80%.

4. Preparación de (4-(2-hidroxipropil)-3-nitrofenil)(4-tritilpiperazin-1-il)metanona

A. Preparación de 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-ona

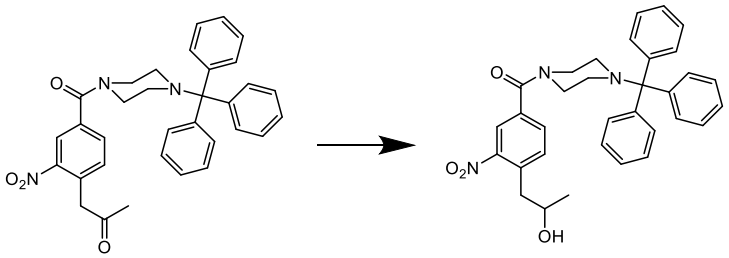


3 **4**

[0304] En un matraz de 100 l con camisa se cargaron en atmósfera de nitrógeno 2 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico (**3**), 18.3 kg de DCM y 1.845 kg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl). La solución se agitó hasta que se formó una mezcla homogénea. Se añadieron 3.048 kg de NTP a lo largo de 30 minutos a temperatura ambiente y se agitó durante 8 horas. Se añadieron 5.44 kg de agua purificada a la mezcla de reacción y se agitó durante 30 minutos. Se dejaron separar las capas y se drenó y almacenó la capa orgánica inferior que contenía el producto. La capa acuosa se extrajo dos veces con 5.65 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de 1.08 kg de cloruro de sodio en 4.08 kg de agua purificada. Las capas orgánicas se secaron sobre 1.068 kg de sulfato de sodio y se filtraron. El sulfato de

sodio se lavó con 1.3 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se suspendieron con 252 g de gel de sílice y se filtraron a través de un embudo de filtro que contenía un lecho de 252 g de gel de sílice. El lecho de gel de sílice se lavó con 2 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se evaporaron en un rotavapor. Se añadieron 4.8 kg de THF al residuo y después se evaporó en el rotavapor hasta que se alcanzaron 2.5 volúmenes de la 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-ona en THF.

B. Preparación de (4-(2-hidroxipropil)-3-nitrofenil)(4-tritilpiperazin-1-il)metanona (**5**)

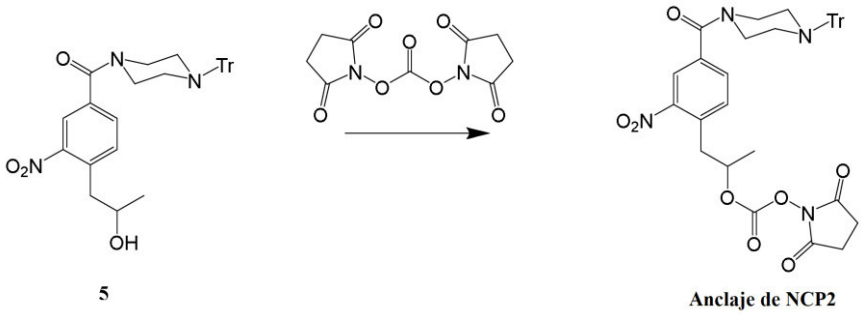


4 5

[0305] En un matraz de 100 l con camisa se cargaron en atmósfera de nitrógeno 3600 g de **4** de la etapa anterior y 9800 g de THF. La solución en agitación se enfrió a ≤ 5 ^{0}C. La solución se diluyó con 11525 g de etanol y se añadieron 194 g de borohidruro de sodio a lo largo de aproximadamente 2 horas a ≤ 5 ^{0}C. La mezcla de reacción se agitó 2 horas adicionales a ≤ 5 ^{0}C. La reacción se inactivó con una solución de aproximadamente 1.1 kg de cloruro de amonio en aproximadamente 3 kg de agua mediante adición lenta para mantener la temperatura a ≤ 10 ^{0}C. La mezcla de reacción se agitó 30 minutos más, se filtró para retirar los componentes inorgánicos y se volvió a cargar en un matraz de 100 l con camisa y se extrajo con 23 kg de DCM. La capa orgánica se separó y la capa acuosa se extrajo dos veces más con 4.7 kg de DCM cada vez. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de aproximadamente 800 g de cloruro de sodio

en aproximadamente 3 kg de agua y después se secó sobre 2.7 kg de sulfato de sodio. Se filtró la suspensión y la torta de filtro se lavó con 2 kg de DCM. Los filtrados combinados se concentraron hasta 2.0 volúmenes, se diluyeron con aproximadamente 360 g de acetato de etilo y se evaporaron. El producto en bruto se cargó en una columna de gel de sílice de 4 kg de sílice empaquetada con DCM en atmósfera de nitrógeno y se eluyó con 2.3 kg de acetato de etilo en 7.2 kg de DCM. Las fracciones combinadas se evaporaron y el residuo se recogió en 11.7 kg de tolueno. La solución de tolueno se filtró y la torta de filtro se lavó dos veces con 2 kg de tolueno cada vez. La torta de filtro se secó hasta un peso constante de 2.275 kg de compuesto **5** (rendimiento del 46% a partir de compuesto **3**) 96.99% por HPLC.

5. Preparación de carbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-il(1-(2-nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazin-1-carbonil)fenil)propan-2-ilo) (**anclaje de NCP2**)



[0306] En un matraz de 100 l con camisa se cargaron en atmósfera de nitrógeno 4.3 kg de compuesto **5** (peso ajustado basándose en el tolueno residual mediante RMN ^{1}H; todos los reactivos después de este punto se escalaron correspondientemente) y 12.7 kg de piridina. A esto se le cargaron 3.160 kg de DSC (78.91 % en peso mediante RMN ^{1}H) mientras que la temperatura interna se mantuvo a ≤ 35 ^{0}C. La

mezcla de reacción se maduró durante aproximadamente 22 horas a temperatura ambiente y después se filtró. La torta de filtro se lavó con 200 g de piridina. En dos lotes, comprendiendo cada uno ½ del volumen de filtrado, el lavado de filtrado se cargó lentamente a un matraz de 100 l con camisa que contenía una solución de aproximadamente 11 kg de ácido cítrico en aproximadamente 50 kg de agua y se agitó durante 30 minutos para permitir la precipitación del sólido. El sólido se recogió con un embudo de filtro, se lavó dos veces con 4.3 kg de agua por lavado y se secó en el embudo de filtro al vacío.

[0307] Los sólidos combinados se cargaron en un matraz de 100 l con camisa y se disolvieron en 28 kg de DCM y se lavaron con una solución de 900 g de carbonato de potasio en 4.3 kg de agua. Después de 1 hora, se dejaron separar las capas y se retiró la capa acuosa. La capa orgánica se lavó con 10 kg de agua, se separó y se secó sobre 3.5 kg de sulfato de sodio. Se filtró el DCM, se evaporó y se secó al vacío hasta dar 6.16 kg de **anclaje de NCP2** (rendimiento del 114%).

Síntesis de resina cargada con anclaje de NCP2

[0308] En un reactor de síntesis de fase sólida de 75 l con una llave de cierre de Teflón se cargaron aproximadamente 52 l de NMP y 2300 g de resina de aminometil poliestireno. La resina se agitó en el NMP para que se hinchase durante aproximadamente 2 horas y después se drenó. La resina se lavó dos veces con aproximadamente 4 l de DCM por lavado, después dos veces con 39 l de solución de neutralización por lavado y después dos veces con 39 l de DCM por lavado. La solución de anclaje de NCP2 se añadió lentamente a la solución de resina en agitación, se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y se drenó. La resina se lavó cuatro veces con 39 l de NMP por lavado y seis veces

con 39 l de DCM por lavado. La resina se trató y agitó con ½ de la solución de rematado de DEDC durante 30 minutos, se drenó y se trató y agitó con la 2ª ½ de la solución de remate de DEDC durante 30 minutos y se drenó. La resina se lavó seis veces con 39 l de DCM por lavado y después se secó en un horno hasta un peso constante de 3573.71 g de resina cargada con anclaje.

Preparación de oligómero de morfolino usando anclaje de NCP2

Síntesis en fase sólida de 50 l de Golodirsen (PMO n.° 1) Sustancia farmacológica en bruto

1 Materiales

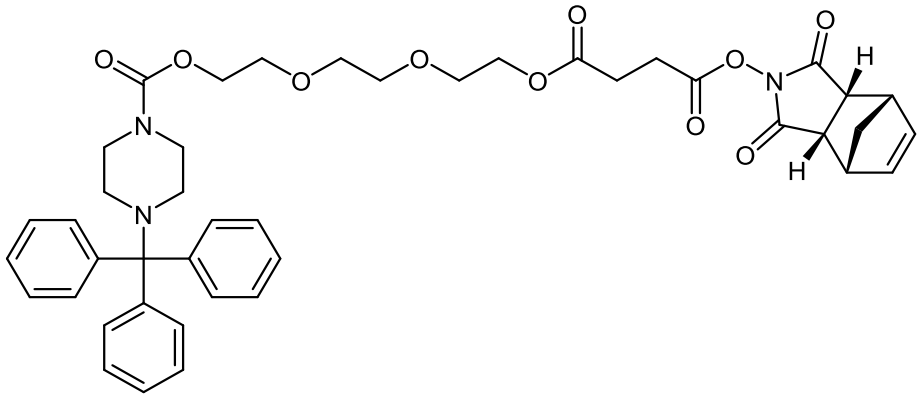
Tabla 2: Materiales de partida

Nombre del material	Nombre químico	Número CAS	Fórmula química	Peso molecular
Subunidad A activada	Ácido fosforamidoclorhídrico, éster de *N*,*N*-dimetil-[6-[6-(benzoilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo	1155373-30-0	$C_{38}H_{37}ClN_7O_4P$	722.2
Subunidad C activada	Ácido fosforamidoclorhídrico, éster de *N*,*N*-dimetil-[6-[4-(benzoilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo	1155373-31-1	$C_{37}H_{37}ClN_5O_5P$	698.2

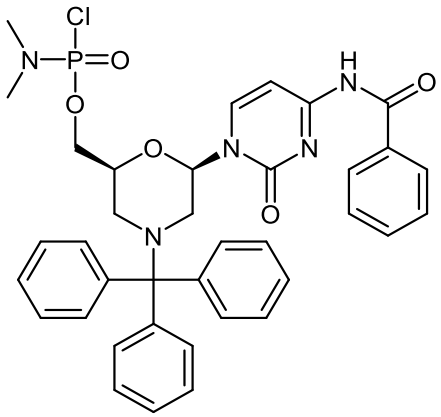
Subunidad de DPG activada	Ácido propanoico, éster de 2,2-dimetil-,4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino)fosfinil]oxi]metil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenilo	1155309-89-9	$C_{51}H_{53}ClN_7O_7P$	942.2
Subunidad T activada	Ácido fosforamidoclorhídrico, éster de *N*,*N*-dimetil-,[6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo	1155373-34-4	$C_{31}H_{34}ClN_4O_5P$	609.1
Cola de EG3 activada	Ácido butanodioico, éster de 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il]4-[2-[2-[2-[[[4-(trifenilmetil)-1-piperazinil]carbonil]oxi]etoxi]etoxi]etilo]	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765.9

Estructuras químicas de los materiales de partida:

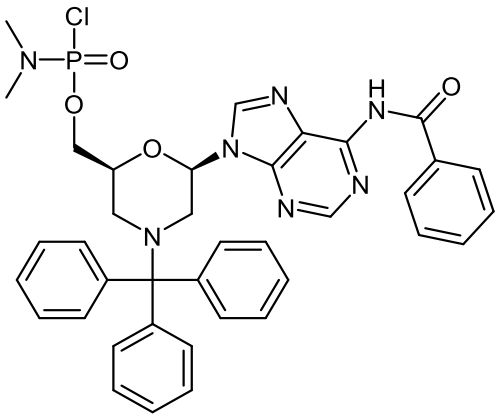
A. Cola de EG3 activada



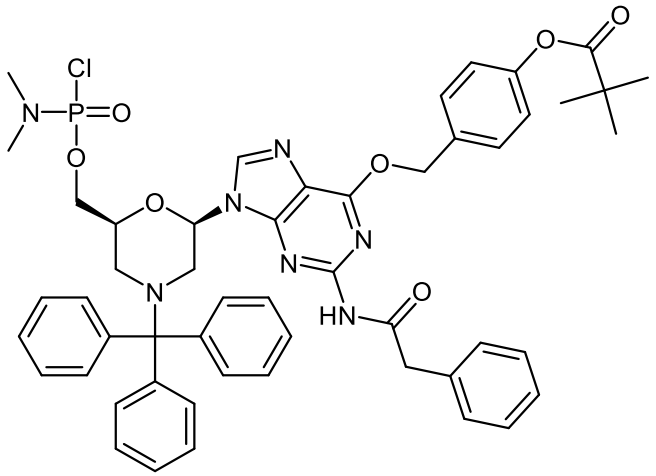
B. Subunidad C activada (para su preparación, véase la Patente de los Estados Unidos n.° 8,067,571)



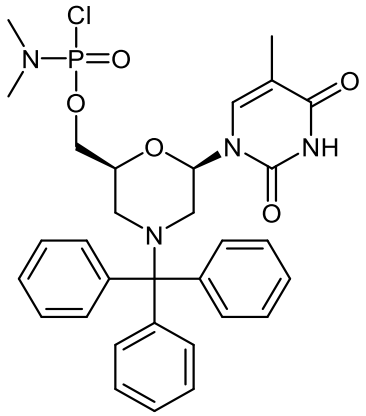
C. Subunidad A activada (para su preparación, véase la Patente de los Estados Unidos n.° 8,067,571)



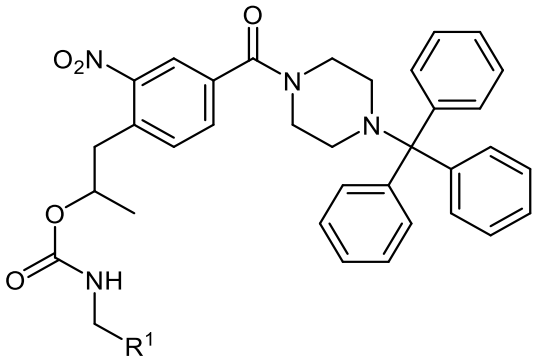
D. Subunidad de DPG activada (para su preparación, véase el documento WO 2009/064471)



E. Subunidad T activada (para su preparación, véase el documento WO 2013/082551)



F. Resina cargada con anclaje



en donde R^1 es un medio de soporte.

Tabla 3: Descripción de las soluciones para la síntesis de oligómero en fase sólida de la sustancia farmacológica en bruto de Golodirsen

Nombre de la solución	Composición de la solución
Solución de anclaje de NCP2	37.5 l de NMP y 1292 g de anclaje de NCP2
Solución de remate de DEDC	4.16 l de dicarbonato de dietilo (DEDC), 3.64 l de NEM y 33.8 l de DCM
Solución de CYTFA	2.02 kg de 4-cianopiridina, 158 l de DCM, 1.42 l de TFA, 39 l de TFE y 2 l de agua purificada
Solución de neutralización	35.3 l de IPA, 7.5 l de DIPEA y 106.5 l de DCM
Solución de escisión	1,530.04 g de DTT, 6.96 l de NMP y 2.98 l de DBU

2. Síntesis de la sustancia farmacológica en bruto de Golodirsen

A. Hinchamiento de la resina

[0309] Se cargaron 750 g de resina cargada con anclaje y 10.5 l de NMP en un reactor silanizado de 50 l y se agitó durante 3 horas. Se drenó el NMP y se lavó la resina cargada con anclaje dos veces con 5.5 l cada vez de DCM y dos veces con 5.5 l cada vez de TFE/DCM al 30%.

B. Ciclo 0: Acoplamiento de cola de EG3

[0310] La resina cargada con anclaje se lavó tres veces con 5.5 l cada vez de TFE/DCM al 30% y se drenó, se lavó con 5.5 l de solución de CYFTA durante 15 minutos y se drenó y nuevamente, se lavó con 5.5 l de solución de CYTFA durante 15 minutos sin drenar, a lo que se cargaron 122 ml de NEM/DCM 1:1 y la suspensión se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se lavó dos veces con 5.5 l de solución de

neutralización durante 5 minutos y se drenó, después dos veces con 5.5 l cada vez de DCM y se drenó. Se cargó una solución de 706.2 g de cola de EG3 activada (PM 765.85) y 234 ml de NEM en 3 l de DMI a la resina y se agitó durante 3 horas a TA y se drenó. La resina se lavó dos veces con 5.5 l cada vez de solución de neutralización durante 5 minutos por cada lavado y una vez con 5.5 l de DCM y se drenó. Se cargó una solución de 374.8 g de anhídrido benzoico y 195 ml de NEM en 2680 ml de NMP y se agitó durante 15 minutos y se drenó. La resina se agitó con 5.5 l de solución de neutralización durante 5 minutos, después se lavó una vez con 5.5 l de DCM y dos veces con 5.5 l cada vez de TFE al 30%/DCM. La resina se suspendió en 5.5 l de TFE al 30%/DCM y se mantuvo durante 14 horas.

C. Ciclos 1-30 de acoplamiento de subunidades

i. Tratamientos preacoplamiento

[0311] Antes de cada ciclo de acoplamiento como se describe en la figura 18, la resina: 1) se lavó con un 30% de TFE/DCM; 2) a) se trató con solución de CYTFA 15 minutos y se drenó y b) se trató con solución de CYTFA durante 15 minutos, a lo que se añadió NEM/DCM 1:1, se agitó y se drenó; 3) se agitó tres veces con solución de neutralización; y 4) se lavó dos veces con DCM. Véase la figura 18.

ii. Tratamientos después del acoplamiento

[0312] Después de drenarse cada solución de subunidad como se describe en la figura 18, la resina: 1) se lavó con DCM; y 2) se lavó dos veces con TFE al 30%/DCM. En caso de mantenerse la resina durante un periodo de tiempo anterior al siguiente ciclo de acoplamiento, no se drenó el segundo lavado de TFE/DCM y la resina se retuvo en dicha solución de lavado de TFE/DCM. Véase la figura 18.

iii.Ciclos de acoplamiento de subunidad activada

[0313] Los ciclos de acoplamiento se llevaron a cabo como se describe en la figura 18.

iv. Lavado final de IPA

[0314] Después de llevar a cabo la etapa de acoplamiento final como se describe en la figura 18, la resina se lavó 8 veces con 19.5 l cada vez de IPA y se secó al vacío a temperatura ambiente durante aproximadamente 63.5 horas hasta un peso seco de 4857.9 g.

C. Escisión

[0315] La sustancia farmacológica en bruto de Golodirsen unida a la resina anterior se dividió en dos lotes, tratándose cada lote del siguiente modo. Un lote de 1619.3 g de resina: 1) se agitó con 10 l de NMP durante 2 h, después se drenó el NMP; 2) se lavó tres veces con 10 l cada vez de TFE al 30%/DCM; 3) se trató con 10 l de solución de CYTFA durante 15 minutos; y 4) 10 l de solución de CYTFA durante 15 minutos, a la que se añadieron posteriormente 130 ml de NEM/DCM 1:1 y se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se trató tres veces con 10 l cada vez de solución de neutralización, se lavó seis veces con 10 l de DCM y ocho veces con 10 l cada vez de NMP. La resina se trató con una solución de escisión de 1530.4 g de DTT y 2980 DBU en 6.96 l de NMP durante 2 horas para desprender la sustancia farmacológica de Eteplisen de la resina. La solución de escisión se drenó y se mantuvo en un vaso separado. El reactor y la resina se lavaron con 4.97 l de NMP, que se combinó con la solución de escisión.

D. Desprotección

[0316] La solución de escisión combinada y el lavado de NMP se transfirieron a un vaso de presión al que se añadieron 39.8 l de NH_4OH ($NH_3 \bullet H_2O$) que se había enfriado hasta una temperatura de -10 ^{0}C a -25 ^{0}C en un congelador. El vaso de

presión se selló y se calentó a 45 ^{0}C durante 16 horas y después se dejó enfriar a 25 ^{0}C. Esta solución de desprotección que contenía la sustancia farmacológica en bruto de Golodirsen se diluyó a 3:1 con agua purificada y el pH se ajustó a 3.0 con ácido fosfórico 2 M, después a pH 8.03 con NH_4OH. HPLC: C18 77.552 % y SCX-10 73.768 %.

Purificación de la sustancia farmacológica en bruto de Golodirsen (PMO n.° 1)

[0317] La solución de desprotección de la parte D anterior, que contenía la sustancia farmacológica en bruto de Golodirsen, se cargó en una columna de resina de intercambio aniónico ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) y se eluyó con un gradiente de 0-35% de B a lo largo de 17 volúmenes de columna (tampón A: hidróxido de sodio 10 mM; tampón B: cloruro de sodio 1 M en hidróxido de sodio 10 mM) y las fracciones de pureza aceptable (HPLC C18 y SCX) se reunieron en una solución de producto farmacológico purificado. HPLC: 93.571% (C18) 88.270% (SCX).

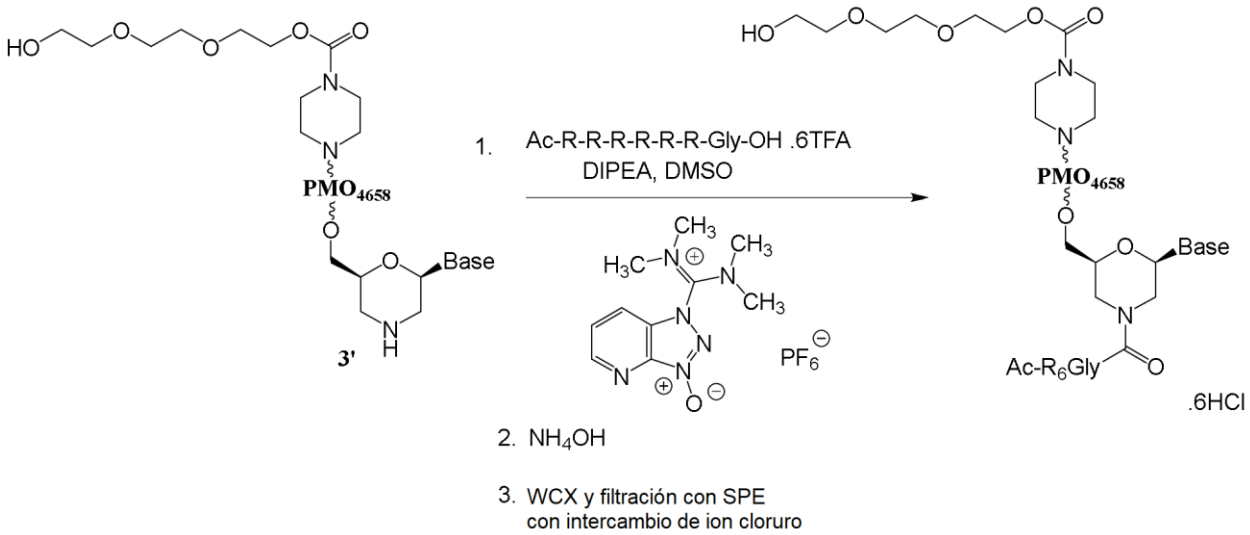
[0318] La solución de sustancia farmacológica purificada se desaló y liofilizó hasta 1450.72 g de sustancia farmacológica de Golodirsen purificada. Rendimiento del 54.56 %; HPLC: 93.531% (C18) 88.354% (SCX).

Tabla 5. Acrónimos

Acrónimo	**Nombre**
DBU	1,8-diazabicicloundec-7-eno
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
DMI	1,3-dimetil-2-imidazolidinona
DTT	Ditiotreitol
IPA	Alcohol isopropílico
PM	Peso molecular
NEM	N-etilmorfolina

NMP	N-metil-2-pirrolidona
TA	Temperatura ambiente
TFA	Ácido 2,2,2-trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol

Ejemplo representativo de conjugación de CPP



[0319] Procedimientos analíticos: Los espectros de masas de ionización de desorción láser asistida por matriz de tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) se registraron en un dispositivo Bruker AutoflexTM Speed, usando una matriz de ácido sinapínico (SA). La SCX-HPLC se llevó a cabo en un sistema Thermo Dionex UltiMate 3000 equipado con un detector de matriz de 3000 diodos y una columna ProPacTM SCX-20 (250 x 4 mm) usando un caudal de 1.0 ml/min (pH = 2; 30 °C de temperatura de la columna). Las fases móviles fueron **A** (acetonitrilo al 25% en agua que contenía H_3PO_4 24 mM) y **B** (acetonitrilo al 25% en agua que contiene KCl 1 M y H_3PO_4 24 mM). Se empleó elución de gradiente: 0 min, 35% de **B**; 2 min, 35% de **B**; 22 min, 80% de **B**; 25 min, 80% de **B**; 25.1 min, 35% de **B**; 30 min, 35% de **B**.

[0320] A una mezcla de PMO4658 (1.82 g, 0.177 mmol, recién secado durante dos días mediante liofilización; SEQ

ID NO: 11), hexatrifluoroacetato de Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH (614.7 mg, 0.354 mmol) y 3-óxido de hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (HATU, 134.4 mg, 0.354 mmol) se le añadió dimetilsulfóxido (DMSO, 20 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos y después se añadió *N*,*N*-diisopropiletilamina (DIPEA, 68.5 mg, 0.530 mmol). Después de 5 minutos, la mezcla nebulosa se convirtió en una solución transparente. La reacción se monitorizó mediante SCX-HPLC. Después de 2 horas, se añadieron 20 ml de solución de hidróxido de amonio al 10% (NH_3 al 2.8%). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales. La reacción se terminó mediante la adición de 400 ml de agua. Se añadió a la solución trifluoroetanol (2.0 ml).

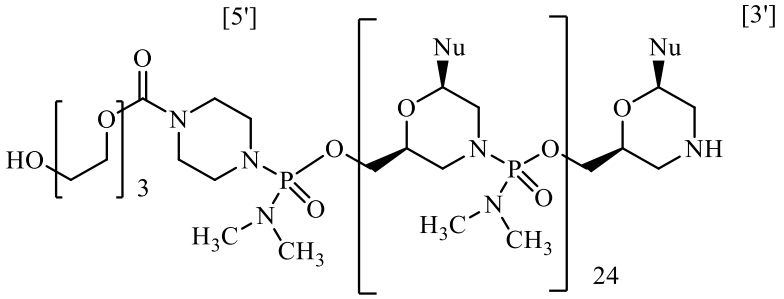
[0321] La solución se dividió en dos porciones y cada porción se purificó mediante una columna WCX (10 g de resina por columna). Cada columna WCX se lavó en primer lugar con acetonitrilo al 20% en agua (v/v) para retirar el material de partida de PMO4658. Los lavados (225 ml para cada columna) se detuvieron cuando el análisis por espectro de masas de MALDI-TOF mostró la ausencia de señal de PMO4658. Después, se lavó cada columna con agua (100 ml por columna). El producto deseado, PPMO4658, se eluyó mediante guanidina HCl 2.0 M (140 ml para cada columna). Las soluciones purificadas de PPMO4658 se reunieron y después se dividieron en dos porciones y cada una se desaló mediante una columna de SPE (10 g de resina para cada columna).

[0322] La columna de SPE se lavó en primer lugar con solución de NaCl acuosa 1.0 M (100 ml para cada columna) para generar la sal de hexaclorhidrato de PPMO4658. Después, se lavó cada columna de SPE con agua (200 ml para cada columna). El PPMO4658 desalado final se eluyó mediante acetonitrilo al 50% en agua (v/v, 150 ml para cada columna).

El acetonitrilo se retiró mediante evacuación a presión reducida. La solución acuosa resultante se liofilizó para obtener el conjugado deseado de hexaclorhidrato de PPMO4658 (1.93 g, rendimiento del 94.5%).

Ejemplo 1: PMO n.° 1

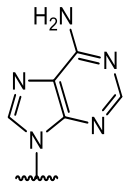
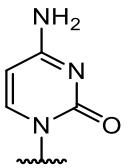
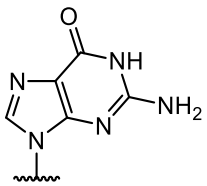
[0323] Usando el protocolo de síntesis de PMO del método B descrito anteriormente, se sintetizó PMO n.° 1:

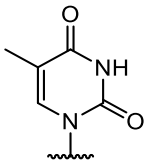


PMO n.° 1

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

Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	T
2	T	7	T	12	T	17	A	22	G
3	T	8	C	13	T	18	A	23	T
4	G	9	C	14	C	19	G	24	T
5	C	10	G	15	T	20	G	25	C

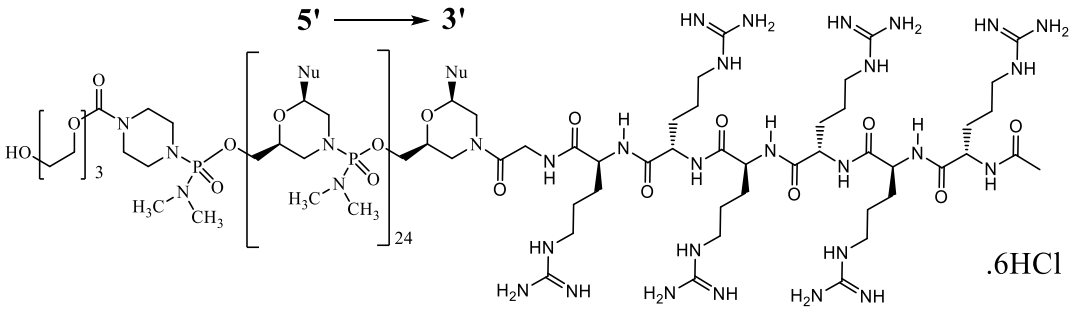
en donde A es  , C es  , G es 

y T es  .

[0324] HPLC: 71.85%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX#97) Gradiente: 75% de A + 20% de B + 5% de C a los 0 min; 50% de A a los 20 min; 25% de A + 75% de C a los 21 min; Fase móvil A: NaOH 10mM/NaCl 20mM; C: NaOH 10mM/NaCL 0.5 M. Temperatura de la columna: 45C; Caudal 1.0 ml/min.

Ejemplo 2: PPMO n.° 1

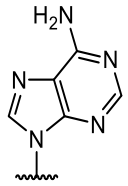
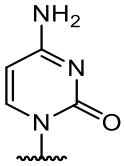
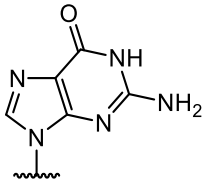
[0325] Usando el protocolo descrito anteriormente para la preparación de PPMO4658, se sintetizó PPMO n.° 1 a partir de PMO n.° 1:

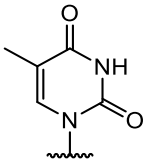


PPMO n.° 1

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

Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu	Posición n.° 5' a 3'	Nu
1	G	6	C	11	G	16	G	21	T
2	T	7	T	12	T	17	A	22	G
3	T	8	C	13	T	18	A	23	T
4	G	9	C	14	C	19	G	24	T
5	C	10	G	15	T	20	G	25	C

en donde A es  , C es  , G es 

y T es  .

Ejemplo 3: Omisión de exón 53 *in vitro* (mioblastos)

[0326] Dos compuestos que se dirigen al exón 53 de distrofina humana (*DMD*) como se describen en la tabla a continuación, PMO n.° 1 y PPMO n.° 1, conteniendo ambos la misma secuencia, se evaluaron respecto de la omisión del exón 53 de *DMD* en mioblastos humanos sanos.

Secuencias de PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 para el exón 53 de *DMD* humana.

Nombre	Secuencia de direccionamiento (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO n.° 1	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1	EG3	H
PPMO n.° 1	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1	EG3	$-G-R_6$

[0327] Específicamente, se sembraron mioblastos humanos sanos (pase 5-6, SKB-F-SL adquiridos de Zen-Bio, Inc.) a ~40% de confluencia, cuando se trataron con PMO n.° 1 o PPMO n.° 1 a diversas concentraciones (es decir, 40 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2.5 µm y 1.25 µm) en medio SKM-M (Zen-Bio, Inc.). Después de noventa y seis horas de incubación, se lavaron los mioblastos con PBS y se lisaron con tampón de lisis RA1 en el kit Illustra GE RNAspin 96 (n.° de cat. 25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). Los ARN totales se aislaron según las recomendaciones del fabricante, excepto por que se usaron 40 µl de agua libre de RNasa para eluir el ARN.

[0328] Para determinar la omisión del exón 53 mediante ambos compuestos, se llevó a cabo RT-PCR final en dos etapas. Específicamente, se retrotranscribieron en primer lugar once microlitros de ARN total en ADNc mediante el kit de síntesis de primera hebra SuperScript IV (n.° de cat. 18091200, Invitrogen) usando hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo añadiendo 9 µl de ADNc en ADN polimerasa Platinum Taq PCR Supermix de alta fidelidad (n.° de cat. 12532024, Invitrogen) con cebadores que se dirigían a la unión de los exones 51/52 y 54 de *DMD* humana (cebador directo: (SEQ ID NO: 5): CATCAAGCAGAAGGCAACAA; cebador inverso: (SEQ ID NO: 6): GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA). La amplificación PCR se llevó a cabo usando un termociclador en tiempo real BioRad CFX96 usando el programa mostrado en la tabla 2. La expresión de los productos de la PCR con omisión o sin omisión se evaluó cargando 32 µl de producto de la PCR en el sistema LabChip GX usando el kit de reactivo de alta sensibilidad de ADN (CLS760672, Perkin Elmer). El porcentaje de omisión del exón 53 de *DMD* se calcula como el porcentaje de la moralidad (nmol/l) para la banda con omisión del exón 53 (201 pb) en comparación con la suma de molaridad para las bandas con omisión (201 pb) y sin omisión (413 pb).

[0329] Se usó la prueba de la t de Student desapareada de dos vías (homoscedástica) para evaluar si las medias de los 2 grupos son estadísticamente diferentes entre sí en cada dosis. El valor $P < 0.05$ se considera como estadísticamente significativo.

Programa del termociclador usado para amplificar amplicones de *DMD* con o sin omisión del exón 53.

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalizar	94°C	2 min

Desnaturalizar	94°C	30 s
Hibridar	61.2°C	30 s
Extender	68°C	1 min
Repetir la etapa 2-4	34 ciclos	
Extensión final	68°C	5 min
Almacenar	4°C	∞

[0330] Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en la **figura 4**. En la **figura 4**, las barras de error representan la media ± DT, "[*Número*] *x*" por encima de las barras indica el múltiplo de cambio relativo en porcentaje de la omisión del exón mediante PPMO n.° 1 en comparación con PMO n.° 1 a cada concentración y "*" indica diferencia significativa entre PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 con valor $p < 0.05$.

Porcentaje de omisión del exón 53 de *DMD* mediante PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 en mioblastos humanos.

Compuesto/	Porcentaje de omisión del exón (media ± DT)					
Dosis (µm)	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO n.° 1	1.27± 0.24	2.19± 0.44	3.58± 0.91	6.56± 1.32	11.06± 2.08	19.57± 4.23
PPMO n.° 1	2.03± 0.48	3.73± 0.70	6.57± 1.47	10.27± 2.78	17.08± 4.61	26.90± 4.78

[0331] Los datos en la tabla anterior y en la **figura 4** muestran sorprendentemente que se obtiene una omisión del exón 53 significativamente mayor en los mioblastos cuando las células se tratan con PPMO n.° 1, en comparación con PMO n.° 1 a todas las concentraciones, cuyo grado es inesperado. Esta mejora significativa se demuestra además en el estudio comparativo en primates no humanos (NHP) *in vivo* del ejemplo 5, donde se trataron NHP con PPMO n.° 1 o PMO n.° 1 y se

midió la omisión del exón 53 en varios tejidos musculares relevantes (véase para más detalles el ejemplo 5). Además, debido a que PPMO n.° 1 se descompone en los medios SKM-M usados en este ejemplo (datos no mostrados) en la escala de tiempo de este estudio, el estudio de NHP de hecho demuestra una mejora aun mayor que la demostrada en este ejemplo.

Ejemplo 4: Estudio en ratones MDX

[0332] El ratón mdx es un modelo animal aceptado y bien caracterizado par la distrofia muscular de Duchenne (DMD) que contiene una mutación en el exón 23 del gen de distrofina. La secuencia antisentido de M23D (SEQ ID NO: 2) se sabe que induce la omisión del exón 23 y restaura la expresión funcional de distrofina. Se administró a ratones MDX de 6-7 semanas de edad una sola inyección en la vena caudal de PPMO4225 o PMO4225 de la tabla a continuación a una dosis de 40 mg/kg o con suero salino.

Nombre	Secuencia de direccionamiento (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	H
PPMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	$-G-R_6$

PMO4225 y PPMO4225 se prepararon cada uno mediante el método A de PMO y los métodos de conjugación de CPP descritos anteriormente.

[0333] Los ratones tratados fueron sacrificados a los 7, 30, 60 y 90 días después de la inyección de una sola dosis (n=6 por grupo). Se procesaron el diafragma, el corazón y el cuádriceps derecho para su análisis por transferencia de Western para medir la producción de proteína distrofina y análisis por RT-PCR para medir el porcentaje de omisión de exones y el cuádriceps derecho se procesó para

inmunohistoquímica y tinción de H/E como se ha descrito anteriormente.

[0334] Se cuantificó la restauración de la proteína distrofina mediante transferencia de Western y el porcentaje de omisión del exón 23 se midió mediante RT-PCR, cada uno como se ha descrito anteriormente.

[0335] Los resultados de la RT-PCR y de la transferencia de Western se muestran en las figuras 5A-10B y en las tablas a continuación. Sorprendentemente, PPMO4225 indujo niveles significativamente mayores y sostenidos de restauración de distrofina y de omisión del exón 23 en comparación con PMO4225, produciéndose los niveles más elevados a los 30 días después de la inyección. Aún más sorprendentemente, PPMO4225 aumentó los niveles de distrofina en el corazón, mientras que PMO4225 no; no se observaron distrofina y omisión del exón en el corazón en todos los puntos de tiempo con PMO4225.

	Cuantificación de la proteína distrofina como porcentaje de la proteína de tipo silvestre (% TS) mediante transferencia de Western							
	Compuesto	**PMO4225**				**PPMO4225**			
	Día	**7**	**30**	**60**	**90**	**7**	**30**	**60**	**90**
Tejido									
Cuádriceps		1.1	2.3	1.6	0.7	20.7	28.1	20.8	8.2
Diafragma		1.4	1.9	1.3	0.6	14.5	15.2	9.8	2.3
Corazón		0	0	0	0	2.0	1.0	0.9	0.1

	Porcentaje de omisión del exón medida mediante RT-PCR							
	Compuesto	**PMO4225**				**PPMO4225**			
	Día	**7**	**30**	**60**	**90**	**7**	**30**	**60**	**90**
Tejido									
Cuádriceps		21.2	5.5	7.9	2.8	61.5	42.02	28.8	6.9
Diafragma		29.9	2.6	0.5	0	51.6	36.76	3.05	0
Corazón		0	0	0	0	13.15	2.64	0	0

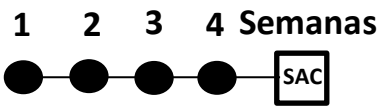
[0336] Los resultados de la inmunohistoquímica se muestran en la figura 11. En este caso, PPMO4225 restaura distrofina por todo el cuádriceps, mientras que 4225 produce un patrón de expresión de "tipo irregular". La distribución uniforme de distrofina con el tratamiento de PPMO4225 indica que puede lograrse un direccionamiento general al músculo esquelético. PPMO4225 tiene un suministro significativamente mejorado frente a PMO4225 *in vivo*.

Ejemplo 5: Omisión del exón 53 en NHP

[0337] Para demostrar adicionalmente la eficacia de la omisión del exón de los oligómeros antisentido de PPMO, se utilizaron primates no humanos. Específicamente, se inyectó por vía intravenosa a monos cinomolgos que tenían tejidos musculares intactos PPMO n.° 1, PMO n.° 1 (del ejemplo 3) o suero salino, de acuerdo con la pauta posológica en la tabla a continuación:

Pauta posológica en cinomolgo

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Número por grupo	Estrategia de suministro
1	Suero salino	0	2	

2	**PPMO n.° 1**	**20**	**3**	 Dosificación una vez a la semana, 4 dosis en total Los animales se sacrifican 48 horas después de la última dosis, en el día 24
3	**PPMO n.° 1**	**40**	**3**	
4	**PPMO n.° 1**	**80**	**3**	
5	**PMO n.° 1**	**40**	**3**	

[0338] Se observó a los animales a lo largo del estudio, incluyendo las observaciones clínicas (por ejemplo, evaluación de la piel y el pelo, efectos respiratorios) y las mediciones del peso corporal. Se tomaron muestras de sangre y orina al menos antes de comenzar el ensayo y 24 horas después de la primera dosis y la última dosis (según fuese aplicable).

[0339] En cada necropsia programada o eutanasia *in extremis*, se recogieron secciones de diafragma, músculo liso del duodeno, colon y aorta, cuádriceps, deltoides, bíceps y corazón y se congelaron inmediatamente. El porcentaje de omisión del exón 53 se determinó usando RT-PCR como se ha descrito anteriormente con cebadores que se dirigían a los exones de DMD 51-54 (cebador directo: TGC CAT CTC CAA ACT AGA AAT GCC A (SEQ ID NO. 9); cebador inverso: GCG GAG GTC TTT GGC CAA CT (SEQ ID NO: 10)). Los resultados se muestran en las figuras 20-27 y en la tabla a continuación.

	Porcentaje de omisión de exones			
Músculo	**PPMO n.° 1**			**PMO n.° 1**
	20 mg/kg	***40 mg/kg***	***80 mg/kg***	***40 mg/kg***
Cuádriceps	35.59	72.94	95.37	2.64
Diafragma	64.64	96.06	99.17	2.23
Bíceps	36.7	93.26	96.91	2.34
Deltoides	48.01	88.89	98.1	2.54
Corazón	29.17	71.53	92.57	1.32
Aorta	53.81	73.77	73.53	30.47
Duodeno	15.75	46.94	74.99	6.94
Colon	27.81	67.98	87.81	8.42

[0340] Sorprendentemente, PPMO n.° 1 produjo niveles profundos de omisión de exones en tejidos intactos ensayados, en comparación con PMO n.° 1. Específicamente, se observó una robusta omisión del exón 53 en los músculos esqueléticos, cardíacos y lisos con PPMO n.° 1. La dosificación semanal de PMO n.° 1 a 40 mg/kg produjo niveles tan solo bajos de omisión del exón 53 en el músculo esquelético y el corazón (1.3-2.6%) y niveles moderados en músculo liso (6.9-30.5%).

[0341] De manera notable e inesperada, mientras que la administración de PMO n.° 1 da como resultado una omisión de entre un 1.32 a un 2.64% en el cuádriceps, el diafragma, el bíceps, el deltoides y el corazón, PPMO n.° 1 produjo una omisión del exón significativa y sustancialmente mayor, por ejemplo, en exceso de al menos 10x mayor a 20 mg/kg, al menos 27x mayor a 40 mg/kg y en exceso del 90% de omisión del exón 53 en todos estos tejidos al nivel de dosis de 80 mg/kg. Es particularmente sorprendente el nivel de omisión del exón logrado en el corazón a, por ejemplo, 80 mg/kg, donde la omisión del exón era en un exceso del 90%, mientras que PMO n.° 1 produjo un 1.32% a 40 mg/kg. Sin desear quedar ligados

a cualquier teoría particular, la administración sistemática y el suministro de PPMO n.° 1 en los tejidos musculares de NHP no distróficos intactos y la obtención de la omisión del exón 53 hasta el grado logrado por PPMO n.° 1 particularmente en músculo cardiaco no podría haberse predicho para el ratón mdx anterior en el ejemplo 4. En cambio, el suministro a tejido sano como en el NHP difiere del suministro a tejido distrófico.

Ejemplo 6: Estudio de respuesta a la dosis en ratones MDX

[0342] Se administró a ratones MDX de 6-7 semanas de edad una sola inyección en la vena caudal de PPMO4225 o PMO4225 descritos anteriormente a una dosis de 40 mg/kg, 80 mg/kg o 120 mg/kg (n=6 por grupo).

[0343] Los ratones tratados fueron sacrificados a los 30 días después de la inyección. El diafragma, cuádriceps y corazón se procesaron para análisis por transferencia de Western para medir la producción de proteína distrofina basándose en el protocolo de transferencia de Western descrito anteriormente (usado, por ejemplo, en el ejemplo 4) con las siguientes modificaciones:

Parámetro	Protocolo de transferencia de Western del ejemplo 4	Modificaciones del protocolo de transferencia de Western
Cuantificación de proteínas	Kit de ensayo de proteína RC DC	Método de BCA
Etapa de bloqueo	Una noche a 4^0C	1 hora a TA
Incubación con anticuerpo primario	1 hora a TA	Una noche a 4^0C

Concentración del anticuerpo primario	1:20	1:500

[0344] La restauración de la proteína distrofina como % del tipo silvestre se presenta en la tabla a continuación y en las figuras 12-15.

	Cuantificación de la proteína distrofina como porcentaje de la proteína de tipo silvestre (% TS) mediante transferencia de Western					
	Compuesto	**PMO4225**			**PPMO4225**		
	Dosis (mg/kg)	**40**	**80**	**120**	**40**	**80**	**120**
Tejido							
Diafragma		0.80	0.97	1.83	8.02	26.03	42.77
Corazón		0.13	0.24	0.34	0.61	6.34	19.48
Cuádriceps		3.5	2.6	3.0	43	90	144

[0345] Sorprendentemente, los datos muestran que una sola dosis de PPMO4225 aumenta los niveles de distrofina de una manera dependiente de la dosis en ratones mdx en un grado significativa y sustancialmente mayor que PMO4225.

Ejemplo 7: Estudio IHC de ratón MDX de diafragma y corazón

[0346] Se administró a ratones MDX de 6-7 semanas de edad una sola inyección en la vena caudal de PPMO4225 a una dosis de 80 mg/kg o suero salino y a los ratones de tipo silvestre de 6-7 semanas de edad se les administró una sola inyección de suero salino. Los ratones mdx tratados, ratones mdx de suero salino y ratones de tipo silvestre fueron sacrificados a los 30 días después de la inyección de una sola dosis (n=4 por grupo). Los resultados de la inmunohistoquímica se muestran en la figura 19. En este caso,

los resultados muestran un aumento uniforme en la distrofina en los tejidos asociados con la morbilidad y la mortalidad en DMD en ratones mdx tratados con PPMO4225.

Ejemplo 8: Omisión de exón 53 *in vitro* (miotubos)

[0347] Dos compuestos que se dirigen al exón 53 de distrofina humana (*DMD*) como se describen en la tabla a continuación, PMO n.° 1 y PPMO n.° 1, conteniendo ambos la misma secuencia, se evaluaron respecto de la omisión del exón 53 de *DMD* en miotubos humanos sanos.

Secuencias de PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 para el exón 53 de *DMD* humana.

Nombre	Secuencia del compuesto	Secuencia de direccionamiento ID NO.	5'	3'
PMO n.° 1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C (SEQ ID NO: 1)	H53(+36+60)	EG3	H
PPMO n.° 1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C (SEQ ID NO: 1)	H53(+36+60 R6G)	EG3	GR6Ac

[0348] Específicamente, se cultivaron mioblastos humanos sanos (pase 5-6, SKB-F-SL adquiridos de Zen-Bio, Inc.) hasta alcanzar una confluencia del 80-90% en medio SKM-M antes de iniciar la diferenciación mediante incubación en medio bajo en suero (SKM-D, Zen-Bio, Inc.). Cinco días después de la diferenciación, los miotubos maduros se incubaron con los compuestos anteriores a diversas concentraciones (es decir, 40 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2.5 µm y 1.25 µm). Después de noventa y seis horas de incubación, se lavaron los miotubos con PBS y se lisaron con tampón de lisis RLT del kit RNeasy Micro (n.° de cat. 74004, Qiagen). Los ARN totales se aislaron según las recomendaciones del fabricante, excepto por que se usaron 20 µl de agua libre de RNasa para eluir el ARN.

[0349] Para determinar la omisión del exón 53 mediante ambos compuestos, se llevó a cabo RT-PCR final en dos etapas. Específicamente, se retrotranscribieron en primer lugar siete microlitros de ARN total en ADNc mediante el kit de síntesis de primera hebra SuperScript IV (n.° de cat. 18091200, Invitrogen) usando hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. La PCR se llevó a cabo añadiendo 5 µl de ADNc en ADN polimerasa Platinum Taq PCR Supermix de alta fidelidad (n.° de cat. 12532024, Invitrogen) con cebadores que se dirigían a la unión de los exones 51/52 y 54 de DMD humana (cebador directo: CAT CAA GCA GAA GGC AAC AA (SEQ ID NO: 5); cebador inverso: GAA GTT TCA GGG CCA AGT CA (SEQ ID NO: 6)). La amplificación PCR se llevó a cabo usando un termociclador en tiempo real BioRad CFX96 usando el programa mostrado en la tabla 2. La expresión de los productos de la PCR con omisión o sin omisión se evaluó cargando 32 µl de producto de la PCR en el sistema LabChip GX usando el kit de reactivo de alta sensibilidad de ADN (CLS760672, Perkin Elmer). El porcentaje de omisión del exón 53 de DMD se calcula como el porcentaje de la moralidad (nmol/l) para la banda con omisión del exón 53 (201 pb) en comparación con la suma de molaridad para las bandas con omisión (201 pb) y sin omisión (413 pb).

[0350] Se usó la prueba de la t de Student desapareada de dos vías (homoscedástica) para evaluar si las medias de los 2 grupos son estadísticamente diferentes entre sí en cada dosis. El valor $P < 0.05$ se considera como estadísticamente significativo.

Programa del termociclador usado para amplificar amplicones de *DMD* con o sin omisión del exón 53.

Etapa	Temperatura	Tiempo
8. Desnaturalizar	94°C	2 min

9. Desnaturalizar	94°C	30 s
10. Hibridar	61.2°C	30 s
11. Extender	68°C	1 min
12. Repetir la etapa 2-4	34 ciclos	
13. Extensión final	68°C	5 min
14. Almacenar	4°C	∞

[0351] Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en la **figura 20**. En la **figura 20**, las barras de error representan la media ± DT, "[Número] x" por encima de las barras indica el múltiplo de cambio relativo en porcentaje de la omisión del exón mediante PPMO n.° 1 en comparación con PMO n.° 1 a cada concentración y "*", "**" indican diferencia significativa entre PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 con valor $p < 0.05$ o 0.005, respectivamente.

Porcentaje de omisión del exón 53 de *DMD* mediante PMO n.° 1 y PPMO n.° 1 en miotubos humanos.

Compuesto/ Dosis (µm)	Porcentaje de omisión del exón (media ± DT)					
	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO n.° 1	1.45±0.39	2.63±0.50	3.33±0.47	4.78±0.88	8.40±0.53	12.98±1.21
PPMO n.° 1	3.10±1.67	2.45±0.52	4.73±1.01	7.08±0.48	9.45±1.03	12.08±1.30

[0352] Los datos en la tabla anterior y en la **figura 24** muestran sorprendentemente que se obtiene una omisión del exón 53 significativamente mayor en los miotubos cuando se tratan las células con PPMO n.° 1 en comparación con PMO n.° 1 al menos a concentraciones de 5 µm y 10 µm, cuyo grado es inesperado. Esta mejora significativa se demuestra además en el estudio comparativo en primates no humanos (NHP) *in vivo* del ejemplo 5, donde se trataron NHP con PPMO n.° 1 o PMO

n.° 1 y se midió la omisión del exón 53 en varios tejidos musculares relevantes (véase para más detalles el ejemplo 5). Además, debido a que PPMO n.° 1 se descompone en los medios SKM-M usados en este ejemplo (datos no mostrados) en la escala de tiempo de este estudio, el estudio de NHP de hecho demuestra una mejora aun mayor que la demostrada en este ejemplo.

****

[0353] Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por referencia como si cada publicación o solicitud de patente individual se incorporase específica e individualmente como incorporada por referencia.

REFERENCIAS

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

Abes, R., et al. (2008). "Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides." J Pept. Sci. **14**: 455-460.

Alter, J., et al. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." Nat. Med. **12**(2): 175-177.

Bestas, B., et al. (2014). "Splice-correcting ligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model." J. Clin. Invest.

Cirak, S., V. Arechavala-Gomeza, 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-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): 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.

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. Tulinius, et al. (2011). "Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular 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.

Jearawiriyapaisarn, N., et al. (2010). "Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers." Cardiovascular Research **85**: 444-453.

Kinali, M., V. Arechavala-Gomeza, 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.

Leblue, B., et al. (2008). "Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides." Adv. Drug Deliv. Rev. **60**: 517-529.

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 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): 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.

McClory, G., et al. (2006). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD." Gene Therapy **13**: 1373-1381.

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.

Moulton, H.M., (2007). "Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication *in vivo*." Biochem. Society Trans **35**(4): 826-828.

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

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

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

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

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.

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). "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.

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 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.

Wu, B., et al. (2012). "Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by peptide-conjugated morpholino." The Am. J. Pathol. **181**(2): 392-400.

Wu, P., et al. (2007) "Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity." Nucleic Acids Research **35**(15): 5182-5191.

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

Yin, H., et al. (2011). "Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin

exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice." Mol. Ther **19**(7): 1295-1303.

Youngblood, D., et al. (2006). "Stability of cell-penetrating peptide- morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells." Am. Chem. Soc.

LISTADO DE SECUENCIAS

Descripción	Secuencia de 5' a 3' de N-terminal a C-terminal	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R_6	RRRRRR	3
R_6-G	RRRRRRG	4
Cebador directo de unión a la unión del exón 51/52 y 54 humano	CATCAAGCAGAAGGCAACAA	5
Cebador directo de unión a la unión del exón 51/52 y 54 humano	GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	6
Cebador directo de unión a exón 23 de ratón	CACATCTTTGATGGTGTGAGG	7
Cebador inverso de unión a exón 23 de ratón	CAACTTCAGCCATCCATTTCTG	8
Cebador directo de unión a la unión del	TGCCATCTCCAAACTAGAAATGCCA	9

exón 51-54 humano		
Cebador inverso de unión a la unión del exón 51-54 humano	GCGGAGGTCTTTGGCCAACT	10
4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	11

[0354] Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención