CONJUGADOS DE OLIGÓMEROS DE SALTO DE EXÓN PARA LA DISTROFIA MUSCULAR

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de EE. UU. n.º 15/993,287, presentada el 30 de mayo de 2018, la Solicitud de EE. UU. n.º 15/993,267, presentada el 30 de mayo de 2018, y la Solicitud Provisional de EE. UU. n.º 62/677,484, presentada el 29 de mayo de 2018. Las instrucciones completas de las solicitudes mencionadas anteriormente se incorporan en su totalidad mediante referencia.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO ELECTRÓNICAMENTE MEDIANTE EFS-WEB

El contenido del listado de secuencias presentado electrónicamente (Nombre: 8163.52.WO00_Sequence_Listing.txt; Tamaño: 3 kilobytes; Fecha de Creación: 16 de mayo de 2019), presentado concurrentemente con la presente, se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN

La presente descripción se refiere a nuevos conjugados de oligómeros antisentido adecuados para el salto del exón 52 en el gen de distrofina humana y composiciones farmacéuticas de estos. La descripción también proporciona métodos para inducir el salto del exón 52 mediante el uso de los nuevos oligómeros antisentido y conjugados de oligómeros antisentido, métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52, y métodos para tratar a un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52.

ANTECEDENTES DE LA DESCRIPCIÓN

Las tecnologías antisentido están siendo desarrolladas mediante el uso de una variedad de químicas para afectar la expresión génica en una variedad de niveles diferentes (transcripción, empalme, estabilidad, traducción). Gran parte de dicha investigación se ha centrado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar los genes anormales o asociados a enfermedades en una amplia gama de indicaciones. Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad, y debido a esto, muchos esfuerzos de investigación, que se refieren a oligómeros como moduladores de la expresión génica, se han centrado en inhibir la expresión de genes objetivo o la función de elementos que actúan en cis. Los oligómeros antisentido se dirigen típicamente contra el ARN, ya sea la cadena sentido (por ejemplo, ARNm), o la cadena negativa en el caso de algunos objetivos de ARN viral. Para lograr un efecto deseado de regulación por disminución del gen específico, los oligómeros generalmente promueven el deterioro del ARNm objetivo, bloquean la traducción del ARNm o bloquean la función de elementos de ARN que actúan en cis, de este modo previenen efectivamente la síntesis *de novo* de la proteína objetivo o la replicación del ARN viral.

Sin embargo, tales técnicas no son útiles cuando el objetivo es regular por aumento la producción de la proteína nativa o compensar mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tales como mutaciones de cambio de marco o sin sentido. En estos casos, la transcripción del gen defectuoso no debe ser sometida a degradación objetivo o inhibición estérica, por lo tanto, la química del oligómero antisentido promoverá el deterioro del ARNm objetivo o el bloqueo de la traducción.

En una variedad de enfermedades genéticas, los efectos de las mutaciones en la expresión eventual de un gen pueden ser modulados a través de un proceso de salto del exón objetivo durante el proceso de empalme. Los procesos de empalme son dirigidos por maquinaria compleja de múltiples componentes que hace que las uniones de exón-intrón adyacentes en el

pre-ARNm se acerquen y realiza la escisión de enlaces fosfodiéster en los extremos de los intrones con su reforma posterior entre exones que se empalmarán juntos. Este proceso complejo y altamente preciso es mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm que son segmentos de ARN semiconservados, relativamente cortos, a los cuales se unen varios factores de empalme nuclear que luego están involucrados en las reacciones de empalme. Al cambiar la forma en la que la maquinaria de empalme lee o reconoce los motivos involucradas en el procesamiento de pre-ARN, es posible crear moléculas de ARNm con empalme diferencial. Se ha reconocido ahora que la mayoría de genes humanos se empalman alternativamente durante la expresión génica normal, aunque los mecanismos involucrados no han sido identificados. Bennett et ál. (Patente de EE. UU. n.º 6,210,892) describen la modulación antisentido del procesamiento de ARNm celular de tipo silvestre mediante el uso de análogos de oligómeros antisentido que no inducen la escisión mediada por ARNasa H del ARN objetivo. Esto es útil para poder generar ARNm alternativamente empalmados que carecen de exones específicos (véase, por ejemplo, como se describe en Sazani, Kole, et ál. 2007 para la generación de receptores de la superfamilia de TNF soluble que carece de exones que codifican los dominios que abarcan la membrana).

En casos donde una proteína normalmente funcional se termina de forma prematura debido a las mutaciones en esta, se ha demostrado que es posible un medio para restaurar alguna producción de la proteína funcional a través de la tecnología antisentido, a través de la intervención durante los procesos de empalme, y que si los exones asociados con mutaciones que causan la enfermedad pueden ser específicamente suprimidos de algunos genes, algunas veces es posible producir un producto de proteína acortada con propiedades biológicas similares a las de la proteína nativa, o con suficiente actividad biológica para mejorar la enfermedad causada por mutaciones asociadas con el exón (véase, por ejemplo, Sierakowska, Sambade et ál. 1996; Wilton, Lloyd et ál. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et ál. 2001; Lu,

Mann et ál. 2003; Aartsma-Rus, Janson et ál. 2004). Kole et ál. (Patentes de EE. UU. n.º: 5,627,274; 5,916,808; 5,976,879; y 5,665,593) describen métodos para combatir el empalme anómalo mediante el uso de análogos de oligómeros antisentido modificados que no promueven el deterioro del pre-ARNm objetivo. Bennett et ál. (Patente de EE. UU. n.º 6,210,892) describen la modulación antisentido del procesamiento de ARNm celular de tipo silvestre también mediante el uso de análogos de oligómeros antisentido que no inducen la escisión mediada por ARNasa H del ARN objetivo.

Es probable que el proceso de salto de exón objetivo sea particularmente útil en genes largos, donde existen muchos exones e intrones, donde existe redundancia en la constitución genética de los exones, o donde una proteína es capaz de funcionar con uno o más exones particulares. Los esfuerzos para redirigir el procesamiento de genes para el tratamiento de enfermedades genéticas asociadas con truncaciones causadas por mutaciones en varios genes se han centrado en el uso de oligómeros antisentido que: (1) se superponen completamente o parcialmente con los elementos involucrados en el proceso de empalme; o (2) se unen al pre-ARNm en una posición suficientemente cercana al elemento para interrumpir la unión y función de los factores de empalme que normalmente podrían mediar una reacción de empalme particular que se produce en dicho elemento.

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

Se ha hallado que una forma menos grave de distrofia muscular, la distrofia muscular de Becker (BMD), se origina cuando una mutación, típicamente una eliminación de uno o más exones,

resulta en un marco de lectura correcto a lo largo de la transcripción completa de distrofina, de manera que la traducción del ARNm en proteína no termina de forma prematura. Si la unión de los exones corriente arriba y corriente 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 retiene alguna actividad, lo que da como resultado un fenotipo de Becker.

Por muchos años se ha conocido que las eliminaciones de un exón o exones que no alteran el marco de lectura de una proteína distrofina podrían dar origen a un fenotipo de BMD, mientras que la eliminación de un exón que causa un cambio de marco provocarán la DMD (Monaco, Bertelson et ál. 1988). En general, las mutaciones de distrofina que incluyen mutaciones puntuales y eliminaciones de exones, que cambian el marco de lectura y de este modo interrumpen la traducción de la proteína apropiada, provocan la DMD. Cabe señalar también que algunos pacientes con BMD y DMD tienen eliminaciones de exones que cubren múltiples exones.

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

Los oligómeros antisentido se han diseñado específicamente para dirigirse a regiones objetivo específicas del pre-ARNm, típicamente exones para inducir el salto de una mutación del gen de DMD, restaurando de este modo estas mutaciones fuera de marco hacia dentro del marco para permitir la producción de la proteína distrofina internamente acortada aún funcional. Tales oligómeros antisentido han sido conocidos por dirigirse completamente dentro del exón (lo que se denomina secuencias internas del exón) o en una unión de donante de empalme o aceptor

de empalme que cruzan desde el exón hacia una parte del intrón.

El descubrimiento y desarrollo de tales oligómeros antisentido para DMD han sido un área de investigación previa. Estos desarrollos incluyen aquellos de: (1) la Universidad de Western Australia y Sarepta Therapeutics (cesionario de esta solicitud): WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Prosensa Technologies (ahora BioMarin Pharmaceutical): WO 02/24906; WO 2004/083432; WO 2004/083446; WO 2006/112705; WO 2007/133105; WO 2009/139630; WO 2009/054725; WO 2010/050801; WO 2010/050802; WO 2010/123369; WO 2013/112053; WO 2014/007620; (3) Carolinas Medical Center: WO 2012/109296; (4) Royal Holloway: patentes y solicitudes que reivindican el beneficio e incluyen serie de EE. UU. n.º 61/096,073 y 61/164,978; tales como US 8,084,601 y US 2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals y Matsuo: US 6,653,466; patentes y solicitudes que reivindican el beneficio e incluyen JP 2000-125448, tales como US 6,653,467; patentes y solicitudes que reivindican el beneficio e incluyen JP 2000-256547, tales como US 6,727,355; WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: WO 2012/029986; WO 2013/100190; WO 2015/137409; WO 2015/194520; y (6) Association Institut de Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthena AG: WO 2010/115993; WO 2013/053928.

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

ál., *Biochemical Society Transactions,* Vol. 35 (4): 826-828, 2007; Yin, H. et ál., *Molecular Therapy,* Vol. 19 (7): 1295-1303, 2011; Abes, R. et ál., *J. Pept. Sci.,* Vol. 14: 455-460, 2008; Lebleu, B. et ál., *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 60: 517-529, 2008; McClorey, G. et ál., *Gene Therapy*, Vol. 13: 1373-1381, 2006; Alter, J. et ál., *Nature Medicine*, Vol. 12 (2): 175-177, 2006; y Youngblood, D. et ál., *American Chemical Society,* Bioconjugate Chem., 2007, 18 (1), págs. 50–60).

Los péptidos de penetración celular (CPP), por ejemplo, un resto de transporte del péptido rico en arginina, pueden ser eficaces para mejorar la penetración, por ejemplo, de un conjugado de oligómeros antisentido con el CPP, en una célula.

A pesar de estos esfuerzos, aún existe una necesidad de oligómeros antisentido mejorados que se dirijan al exón 52 y composiciones farmacéuticas correspondientes que sean potencialmente útiles para métodos terapéuticos para producir distrofina y tratar la DMD.

COMPENDIO DE LA DESCRIPCIÓN

Los conjugados de oligómeros antisentido proporcionados en la presente incluyen un resto de oligómero antisentido conjugado con un CPP. En un aspecto, la descripción proporciona conjugados de oligómeros antisentido que comprenden:

un oligómero antisentido de 25 subunidades de longitud capaz de unirse a un objetivo seleccionado para inducir el salto de exón en el gen de distrofina humana, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región objetivo del exón 52 del pre-ARNm de distrofina, indicada como un sitio de hibridación; y

un péptido de penetración celular (CPP) conjugado con el oligómero antisentido mediante un resto enlazador.

En algunas modalidades, el sitio de hibridación es H52A(-01+24).

En algunas modalidades, las bases del oligómero antisentido están enlazadas a estructuras de

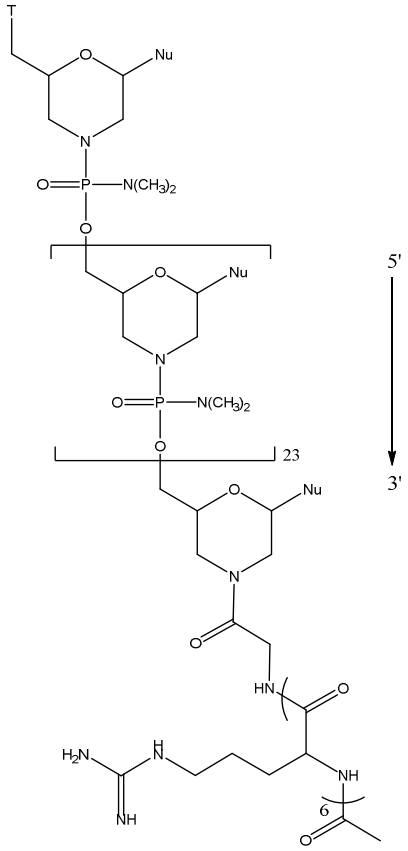
anillo de morfolino, en donde las estructuras de anillo de morfolino están unidas por enlaces entre subunidades que contienen fósforo, que unen un nitrógeno de morfolino de una estructura de anillo a un carbono exocíclico 5' de una estructura de anillo adyacente. En ciertas modalidades, el péptido de penetración celular está formado por seis unidades de arginina ("R_6") y el resto enlazador es una glicina. En algunas modalidades, el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases indicada como SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la descripción proporciona oligómeros antisentido de 25 subunidades de longitud capaces de unirse a un objetivo seleccionado para inducir el salto de exón en el gen de distrofina humana, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región objetivo del exón 52 del pre-ARNm de distrofina, indicada como un sitio de hibridación.

En algunas modalidades, el sitio de hibridación es H52A(-01+24).

En algunas modalidades, las bases del oligómero antisentido están enlazadas a estructuras de anillo de morfolino, en donde las estructuras de anillo de morfolino están unidas por 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 algunas modalidades, el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases indicada como SEQ ID NO: 1.

En varios aspectos, la descripción proporciona conjugados de oligómeros antisentido que pueden estar de acuerdo con la Fórmula (I):

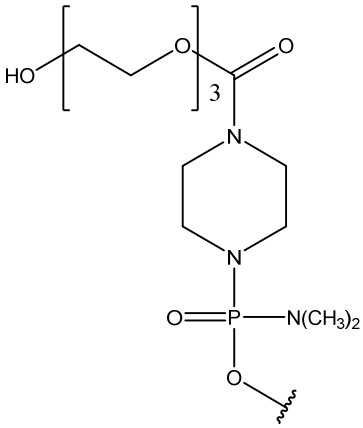


(I)

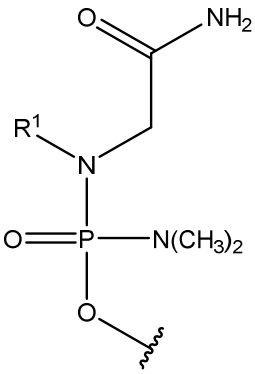
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto forma una secuencia objetivo; y

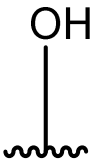
T es un resto seleccionado de:



;



; y

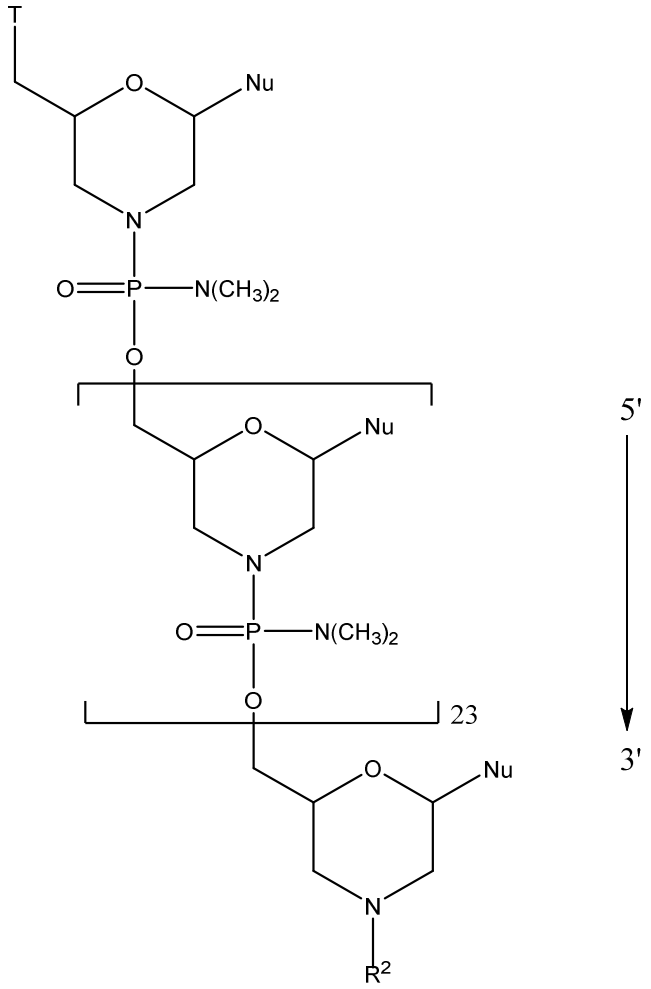


;

R^1 es alquilo C_1-C_6;

en donde la secuencia objetivo es complementaria a un sitio de hibridación del exón 52 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24).

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

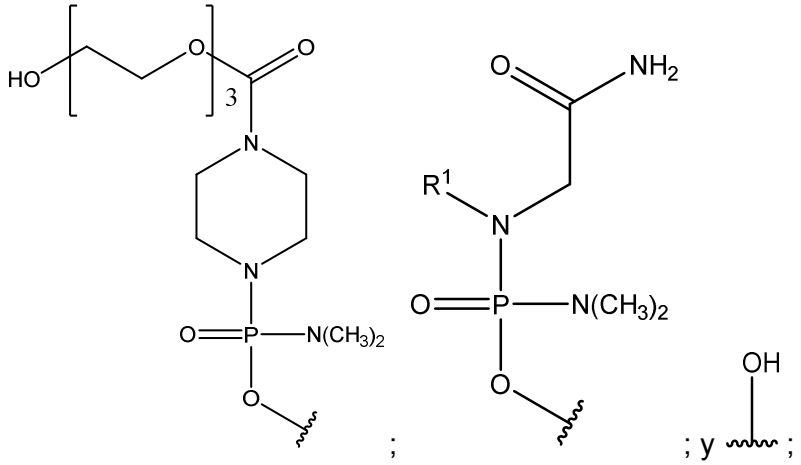


(V)

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, en donde:

cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto forma una secuencia objetivo;

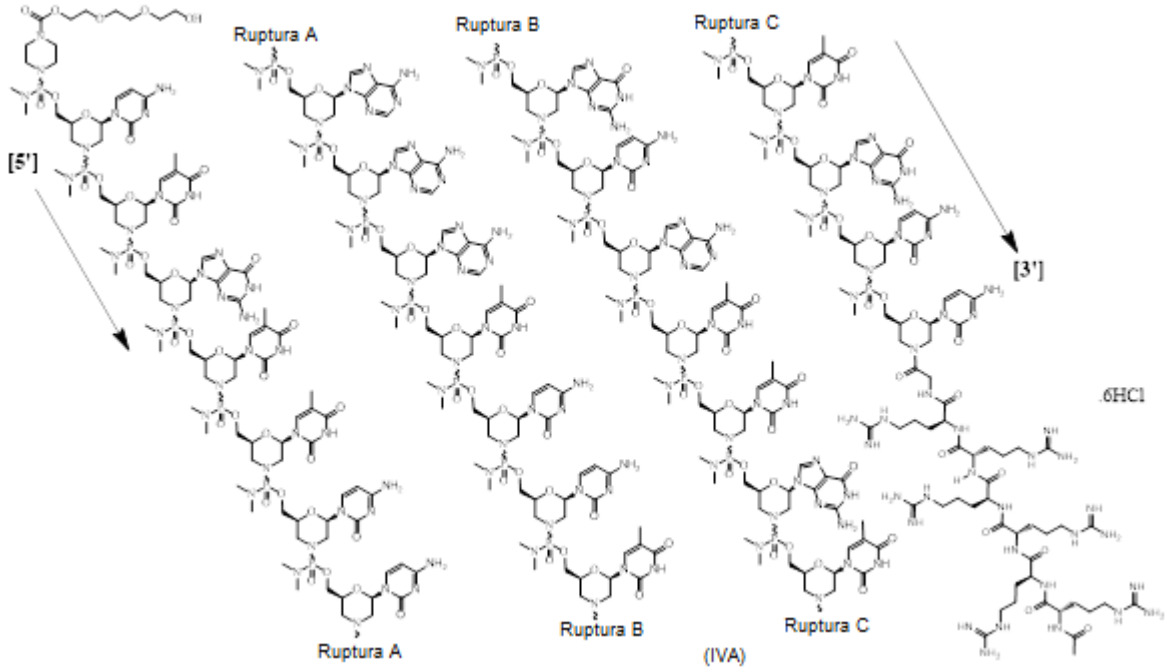
T es un resto seleccionado de:



R^1 es alquilo C_1-C_6; y

R^2 se selecciona de H o acetilo, en donde la secuencia objetivo es complementaria a un sitio de hibridación del exón 52 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24).

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



En otro aspecto, la descripción proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen los oligómeros antisentido o conjugados de oligómeros antisentido de la descripción, y un portador

farmacéuticamente aceptable. En algunas modalidades, el portador farmacéuticamente aceptable es una solución salina que incluye un amortiguador de fosfato.

En otro aspecto, la descripción 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 al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido de la descripción. La descripción también aborda el uso de oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido de la descripción, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de 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 al salto del exón 52.

En otro aspecto, la descripción 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 al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción. En otro aspecto, la descripción proporciona un método para excluir el exón 52 del pre-ARNm de distrofina durante el procesamiento de ARNm en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción. En otro aspecto, la descripción proporciona un método de unión del exón 52 del pre-ARNm de distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción.

En otro aspecto, la descripción proporciona un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción para su uso en terapia. En ciertas modalidades, la descripción proporciona un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero

antisentido de la descripción para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. En ciertas modalidades, la descripción proporciona un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia. En ciertas modalidades, la descripción proporciona un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

En otro aspecto, la descripción también proporciona kits 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 al salto del exón 52, donde dichos kits comprenden al menos un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción, envasados en un recipiente adecuado e instrucciones para su uso.

Estos y otros objetos y características se comprenderán completamente cuando se lea la siguiente descripción detallada de la descripción junto con las figuras.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** ilustra una sección de pre-ARNm de distrofina normal y ARNm maduro.

La **Figura 2** ilustra una sección de pre-ARNm de distrofina anormal (ejemplo de DMD) y la distrofina inestable no funcional resultante.

La **Figura 3** ilustra la restauración de eteplirsen, diseñado para saltar el exón 51, de la lectura “dentro del marco” de pre-ARNm.

La **Figura 4** proporciona una gráfica de barras del porcentaje de salto del exón 52 en mioblastos humanos sanos mediante PMO#1 y PPMO#1 en varias concentraciones 96 horas después del tratamiento, según se mide por RT-PCR. Las barras de error representan el promedio ± SD.

Las **Figuras 5A-5D** proporcionan imágenes representativas del análisis de transferencia

Western que mide la proteína distrofina en los cuádriceps de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes momentos [7 días (5A), 30 días (5B), 60 días (5C), y 90 días (5D)].

La **Figura 6A** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en los cuádriceps de ratones mdx durante 90 días después de la inyección, según se determina por análisis de transferencia Western.

La **Figura 6B** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de salto del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en los cuádriceps de ratones mdx durante 90 días después de la inyección, según se determina por RT-PCR.

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

La **Figura 8A** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx durante 90 días después de la inyección, según se determina por análisis de transferencia Western.

La **Figura 8B** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de salto del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx durante 90 días después de la inyección, según se determina por RT-PCR.

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

La **Figura 10A** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de ratones mdx durante 90 días después de la inyección, según se determina por análisis de transferencia Western.

La **Figura 10B** proporciona una gráfica de líneas que representa el porcentaje de salto del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de ratones mdx durante 90 días después de la inyección, según se determina por RT-PCR.

La **Figura 11** proporciona un análisis de inmunohistoquímica que muestra la distrofina en cuádriceps izquierdo de ratones mdx inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225).

Las **Figuras 12A-B** proporcionan imágenes representativas del análisis de transferencia Western que mide 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.

La **Figura 13** proporciona una gráfica de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de mdx según se determina por análisis de transferencia Western 30 días después de la inyección para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg, y 120 mg/kg.

Las **Figuras 14A-B** proporcionan imágenes representativas del análisis de transferencia Western que mide 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.

La **Figura 15** proporciona una gráfica de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx según se determina por análisis de transferencia Western 30 días después de la inyección para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg, y 120 mg/kg.

Las **Figuras 16A-B** proporcionan imágenes representativas de análisis de transferencia Western que mide la proteína distrofina en los cuádriceps de ratones mdx tratados con PMO

(PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg, y 120 mg/kg.

La **Figura 17** proporciona una gráfica de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en los cuádriceps de ratones mdx según se determina por análisis de transferencia Western 30 días después de la inyección para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg, y 120 mg/kg.

La **Figura 18** muestra los ciclos de acoplamiento realizados por el Método de síntesis B de PMO.

La **Figura 19** proporciona un análisis de inmunohistoquímica que muestra la distrofina y laminina en diafragma y corazón de ratones mdx inducidas por PPMO (PPMO4225), en comparación con solución salina en ratones mdx y ratones de tipo silvestre.

La **Figura 20** proporciona una gráfica de barras del porcentaje de salto del exón 52 en miotubos humanos sanos mediante PMO#1 y PPMO#1 en varias concentraciones 96 horas después del tratamiento, según se mide por RT-PCR. Las barras de error representan el promedio ± SD.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Modalidades de la presente descripción se refieren generalmente a oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido mejorados, y a métodos de uso que los comprenden, que son específicamente diseñados para inducir salto de exón en el gen de distrofina humana. La distrofina juega un papel vital en la función muscular, y varias enfermedades relacionadas con el músculo son caracterizadas por formas mutadas de este gen. Por lo tanto, en ciertas modalidades, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido mejorados descritos en la presente inducen salto de exón en formas mutadas del gen de distrofina humana, tal como los genes distrofina mutados encontrados en distrofia muscular de Duchenne (DMD) y distrofia muscular de Becker (BMD).

Debido a los eventos de empalme de ARNm anómalos causados por mutaciones, estos genes

de distrofina humana mutados expresan la proteína distrofina defectuosa o expresan distrofina no medible en absoluto, una afección que produce varias formas de distrofia muscular. Para remediar esta afección, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción se hibridan en regiones seleccionadas de un ARNm preprocesado de un gen de distrofina humana mutado, inducen el salto de exón y el empalme diferencial en ese ARNm de distrofina, que de otro modo se empalma de forma anómala, y de este modo permiten que las células musculares produzcan una transcripción de ARNm que codifica una proteína distrofina funcional. En ciertas modalidades, la proteína distrofina resultante no es necesariamente la forma de “tipo silvestre” de distrofina, sino que es una forma de distrofina truncada aún funcional.

Al aumentar los niveles de proteína distrofina funcional en las células musculares, estas modalidades y modalidades 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 a un empalme de ARNm anómalo. Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido específicos descritos en la presente proporcionan, además, un direccionamiento específico del exón de distrofina mejorado con respecto a otros oligómeros, y de este modo ofrecen ventajas significantes y prácticas con respecto a métodos alternos para tratar las formas relevantes de distrofia muscular.

Por lo tanto, la descripción se refiere a conjugados de oligómero antisentido que comprenden:

un oligómero antisentido de 25 subunidades de longitud capaz de unirse a un objetivo seleccionado para inducir el salto de exón en el gen de distrofina humana, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región objetivo del exón 52 del pre-ARNm de distrofina, indicada como un sitio de hibridación; y

un péptido de penetración celular (CPP) conjugado al oligómero antisentido mediante un resto

enlazador.

La descripción también se refiere a oligómeros antisentido de 25 subunidades de longitud capaces de unirse a un objetivo seleccionado para inducir el salto de exón en el gen de distrofina humana, en donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria a una región objetivo del exón 52 del pre-ARNm de distrofina, indicada como un sitio de hibridación.

En algunas modalidades de los oligómeros antisentido y los conjugados de oligómero antisentido de la descripción, el sitio de hibridación es H52A(-01+24).

En algunas modalidades, las bases del oligómero antisentido están enlazadas 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 modalidades, el péptido de penetración celular es R_6 y el resto enlazador es una glicina. En algunas modalidades, el oligómero antisentido comprende la secuencia de bases indicada como SEQ ID NO: 1, en donde cada base de timina (T) es opcionalmente una base de uracilo (U).

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la descripción. Aunque en la práctica o las pruebas de la presente descripción pueden utilizarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, se describen los métodos y materiales preferidos. Para los propósitos de la presente descripción, a continuación, se definen los siguientes términos.

I. <u>Definiciones</u>

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

o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, peso o longitud de referencia.

El término “alquilo”, tal como se usa en la presente, a menos que se indique de otro modo, se refiere a un hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada. En ciertas modalidades, el grupo alquilo es un hidrocarburo primario, secundario, o terciario. En ciertas modalidades, el grupo alquilo incluye de uno a diez átomos de carbono, es decir, alquilo C_1 a C_{10}. En ciertas modalidades, el grupo alquilo incluye de uno a seis átomos de carbono, es decir, alquilo C_1 a C_6. En ciertas modalidades, el grupo alquilo se selecciona del grupo que consiste de 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 sustituidos y no sustituidos, que incluyen grupos alquilo halogenados. En ciertas modalidades, el grupo alquilo es un grupo alquilo fluorado. Los ejemplos no taxativos de restos con los cuales puede ser sustituido el grupo alquilo se seleccionan del grupo que consiste de halógeno (fluoro, cloro, bromo, o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato, o fosfonato, no protegido o protegido según sea necesario, tal como lo conocen los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se muestra en Greene, et ál., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991, que se incorporan a la presente mediante referencia.

Se pretende que “susceptible al salto del exón 52”, tal como se usa en la presente con respecto a un sujeto o paciente, incluya sujetos y pacientes que tienen una o más mutaciones en el gen de distrofina, el cual la ausencia del salto del exón 52 del pre-ARNm de distrofina, causa que el marco de lectura esté fuera del marco, lo que interrumpe la traducción del pre-ARNm y provoca una incapacidad del sujeto o paciente para producir distrofina funcional o semifuncional. Los ejemplos de mutaciones en el gen de distrofina que son susceptibles al salto del exón 52

incluyen, por ejemplo, la eliminación de: exones 2 a 51, exones 8 a 51, exones 20 a 51, exones 22 a 51, exón 51, exón 53, exones 53 a 55, exones 53 a 57, exones 53 a 59, exones 53 a 60, exones 53 a 67, exones 53 a 69, exones 53 a 75, y exones 53 a 78. La determinación de si un paciente tiene una mutación en el gen de distrofina que es susceptible al salto de exón también se encuentra dentro del alcance de un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Aartsma-Rus et ál. (2009) Hum Mutat. 30:293-299; Gurvich et ál., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640; y Fletcher et ál. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223).

El término “oligómero”, tal como se usa en la presente, se refiere a una secuencia de subunidades conectadas por enlaces entre subunidades. En ciertos casos, la expresión “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 de esta; y (ii) una nucleobase unida a esta, de manera que el orden de los restos de emparejamiento de bases forme una secuencia de bases complementaria a una secuencia objetivo en un ácido nucleico (típicamente, un ARN) mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia objetivo, con la condición de que la subunidad, el enlace entre subunidades, o ambos, no sean de origen natural. En ciertas modalidades, el oligómero antisentido es un PMO. En otras modalidades, el oligómero antisentido es un 2’-O-metilo fosforotioato. En otras modalidades, el oligómero antisentido de la descripción es un ácido nucleico peptídico (PNA), un ácido nucleico bloqueado (LNA), un ácido nucleico puenteado (BNA) tal como ácido nucleico puenteado con 2’-O,4’-C-etileno (ENA). En la presente se describen modalidades ilustrativas adicionales.

Los términos “complementario/a” y “complementariedad” se refieren a dos o más oligómeros (es decir, cada uno comprende una secuencia de nucleobases) que se relacionan entre sí mediante 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 cual menos de todas las nucleobases de una secuencia de nucleobases dada se emparejan con la otra secuencia de nucleobases de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, en algunas modalidades, la complementariedad entre una secuencia de nucleobases dada y la otra secuencia de nucleobases puede ser de alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 % o alrededor de 95 %. O, puede haber 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 significantes sobre la eficiencia y resistencia de la hibridación entre las secuencias.

Las expresiones "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se usan de forma indistinta en la presente y se refieren a una cantidad del compuesto terapéutico, tal como un oligómero antisentido, administrada a un sujeto mamífero, como una dosis única o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado. Para un oligómero antisentido, este efecto es provocado típicamente al inhibir la traducción o el procesamiento de empalme natural de una secuencia objetivo seleccionada, o al producir una cantidad clínicamente significativa de distrofina (significación estadística).

En algunas modalidades, una cantidad eficaz es de al menos 10 mg/kg, o al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido durante un período de tiempo para tratar al sujeto. En algunas modalidades, una cantidad eficaz es de al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para aumentar la cantidad de fibras de distrofina positivas en un sujeto hasta al menos 20 % de lo normal. En ciertas modalidades, una cantidad eficaz es de 10 mg/kg o al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para estabilizar, mantener o mejorar una distancia de caminata de un 20 % de déficit, por ejemplo, en una prueba de 6 MWT en un paciente con respecto a un

compañero sano. En varias modalidades, una cantidad eficaz es de al menos 10 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg, al menos 20 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg, alrededor de 25 mg/kg a alrededor de 30 mg/kg, o alrededor de 30 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg. En algunas modalidades, una cantidad eficaz es de alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 30 mg/kg, o alrededor de 50 mg/kg. En otro aspecto, una cantidad eficaz es de al menos alrededor de 10 mg/kg, alrededor de 20 mg/kg, alrededor de 25 mg/kg, alrededor de 30 mg/kg, o de alrededor de 30 mg/kg a alrededor de 50 mg/kg, durante al menos 24 semanas, al menos 36 semanas, o al menos 48 semanas, para aumentar de ese modo la cantidad de fibras de distrofina positivas en un sujeto hasta al menos 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 % de lo normal, y estabilizar o mejorar la distancia de caminata de un 20 % de déficit, por ejemplo, en una prueba de 6 MWT en el paciente con respecto a un compañero sano. En algunas modalidades, el tratamiento aumenta la cantidad de fibras de distrofina positivas hasta 20-6 0%, o 30-50 % de lo normal en el paciente.

Los términos “mejorar” o “mejora”, o “aumentar” o “aumento”, o “estimular” o “estimulación” se refieren generalmente a la capacidad de uno o más oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido, o composiciones farmacéuticas de cualquiera de los anteriores, para producir o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos corriente abajo) en una célula o un sujeto, en comparación con la respuesta causada sin oligómero antisentido, sin conjugado de oligómero antisentido, o un compuesto de control. Una respuesta fisiológica mayor puede incluir una expresión aumentada de una forma funcional de una proteína distrofina, o una actividad biológica relacionada con distrofina aumentada en el tejido muscular, entre otras respuestas evidentes a partir de la comprensión en la técnica y la descripción de la presente. La función muscular aumentada también puede medirse, e incluye aumentos o mejoras en la función muscular de alrededor de 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %,

10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 %. El porcentaje de fibras musculares que expresan una distrofina funcional también puede medirse, e incluye un aumento de la expresión de distrofina de alrededor de 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 demostrado que alrededor de 40 % de la mejora de la función muscular puede producirse si 25-30 % de las fibras expresan distrofina (véase, por ejemplo, DelloRusso et ál, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). Una cantidad “aumentada” o “mejorada” es típicamente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir un aumento 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, lo que incluye todos los números enteros y decimales intermedios y superiores a 1), por ejemplo, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, etc.) con respecto a la cantidad producida por la ausencia de un agente (sin oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido) o un compuesto de control.

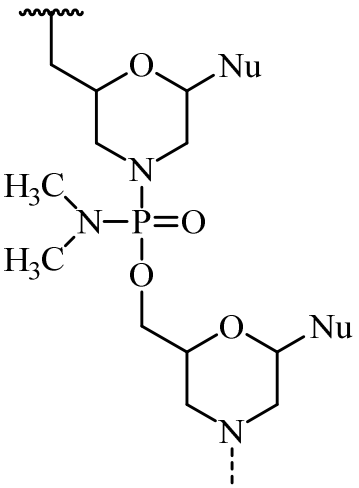
Tal como se usan en la presente, los términos “función” y “funcional”, y similares, se refieren a una función biológica, enzimática, o terapéutica.

Una proteína distrofina “funcional” se refiere generalmente a una proteína distrofina que tiene suficiente actividad biológica para reducir la degradación progresiva del tejido muscular, que es de otro modo una característica de la distrofia muscular, típicamente según se compara con la forma alterada o “defectuosa” de proteína distrofina que está presente en ciertos sujetos con DMD o BMD. En ciertas modalidades, una proteína distrofina funcional puede tener alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % (lo que incluye todos los números enteros intermedios) de la actividad biológica *in vitro* o *in vivo* de distrofina de tipo silvestre, según se mide de acuerdo con las técnicas de habituales en la técnica. A modo de ejemplo, la actividad relacionada con la distrofina en los cultivos musculares *in vitro* puede

medirse de acuerdo con el tamaño del miotubo, la organización (o desorganización) de las miofibrillas, la actividad contráctil, y el agrupamiento espontáneo de receptores de acetilcolina (véase, por ejemplo, Brown et ál., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999). Los modelos animales también son recursos valiosos para estudiar la patogénesis de la enfermedad, y proporcionan un medio para evaluar la actividad relacionada con la distrofina. Dos de los modelos animales más ampliamente usados para la investigación de la DMD son el ratón mdx y el perro con distrofia muscular golden retriever (GRMD), los cuales son negativos para distrofina (véase, por ejemplo, Collins y Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Estos y otros modelos animales pueden usarse para medir la actividad funcional de varias proteínas distrofinas. Se incluyen las formas truncadas de distrofina, tales como aquellas formas que son producidas después de la administración de algunos de los oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido de salto de exón de la presente descripción.

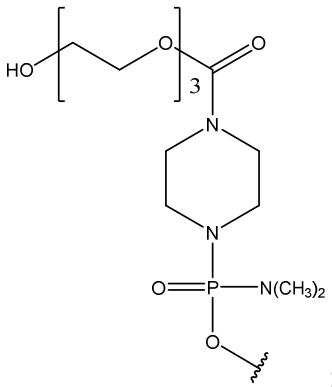
Las expresiones “mal emparejado/a” o “emparejamientos incorrectos” se refieren a una o más nucleobases (sean contiguas o separadas) en una secuencia de nucleobases de oligómero que no se emparejan con un pre-ARNm objetivo de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. Si bien a menudo se desea la complementariedad perfecta, algunas modalidades pueden incluir uno o más, pero preferentemente, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 emparejamientos incorrectos con respecto al pre-ARNm objetivo. Se incluyen variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En ciertas modalidades, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción incluyen variaciones en la secuencia de nucleobases cerca de las variaciones de los extremos en el interior y, si están presentes, están típicamente dentro de alrededor de 6, 5, 4, 3, 2 o 1 subunidades de los extremos 5’ y/o 3’.

Las expresiones “morfolino”, “oligómero de morfolino”, y “PMO” se refieren a un oligómero de morfolino de fosforodiamidato de la siguiente estructura general:

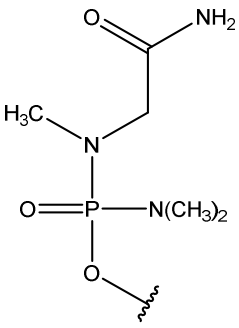


y tal como se describe en la Figura 2 de Summerton, J., et ál., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Los morfolinos, tal como se describen en la presente, incluyen todos los estereoisómeros y tautómeros de la estructura general anterior. La síntesis, las estructuras y las características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las Patentes de EE. UU. n.º: 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; las cuales se incorporan a la presente mediante referencia.

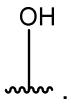
En ciertas modalidades, un morfolino está conjugado al extremo 5’ o 3’ del oligómero con un resto de “cola” para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Los ejemplos de colas incluyen:



;

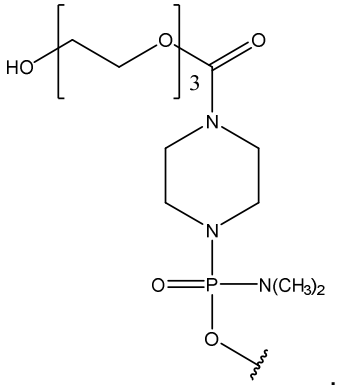


; y

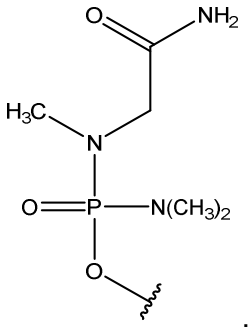


.

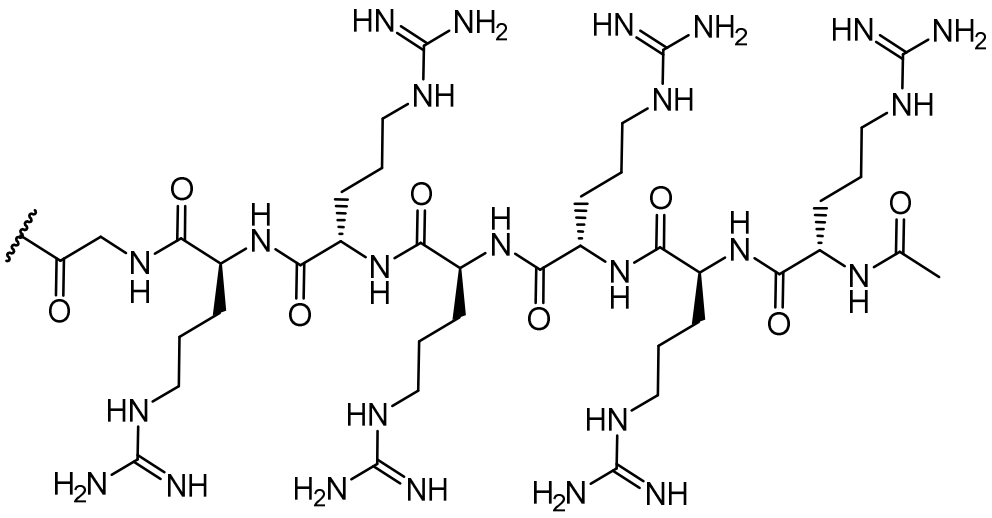
De los ejemplos de restos de cola anteriores, “TEG” o “EG3” se refiere al siguiente resto de cola:



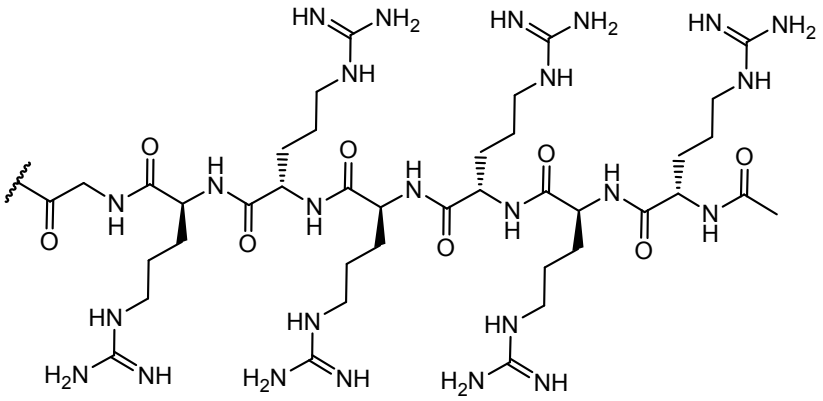
De los ejemplos de restos de cola anteriores, “GT” se refiere al siguiente resto de cola:



Tal como se usan en la presente, las expresiones “-G-R_6” y “-G-R_6-Ac” se usan de forma indistinta y se refieren a un resto peptídico conjugado con un oligómero antisentido de la descripción. En varias modalidades, “G” representa un residuo de glicina conjugado a “R_6” por un enlace amida, y cada “R” representa un residuo de arginina conjugado entre sí por enlaces amida de manera que “R_6” significa seis (6) residuos de arginina conjugados entre sí por enlaces amida. Los residuos de arginina pueden tener cualquier configuración estereo, por ejemplo, los residuos de arginina pueden ser residuos de L-arginina, residuos de D-arginina, o una mezcla de residuos de D- y L-arginina. En ciertas modalidades, “-G-R_6” o “-G-R_6-Ac” se conjuga con el nitrógeno del anillo morfolina de la subunidad de morfolino más hacia 3’ de un oligómero antisentido PMO de la descripción. En algunas modalidades, “-G-R_6” o “-G-R_6-Ac” se conjuga con el extremo 3’ de un oligómero antisentido de la descripción y tiene la siguiente fórmula:



, o



.6HCl

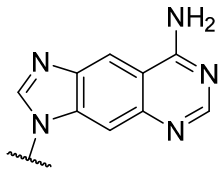
.

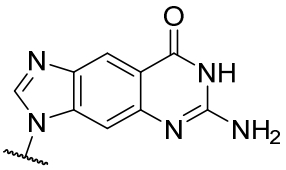
Las expresiones “nucleobase” (Nu), “resto de emparejamiento de bases” o “base” se usan de forma indistinta para hacer referencia a una base de purina o pirimidina que se encuentra en el ADN o ARN de origen natural o “nativo” (por ejemplo, uracilo, timina, adenina, citosina y guanina), así como también análogos de estas purinas y pirimidinas de origen natural. Estos análogos pueden conferir propiedades mejoradas, tales como afinidad de unión, al oligómero. Los ejemplos de análogos incluyen hipoxantina (el componente base de la inosina); 2,6-diaminopurina; 5-metil citosina; pirimidinas modificadas con C5-propinilo; 10-(9-(aminoetoxi)fenoxazinil)(sujeción G), y similares.

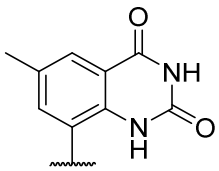
Los ejemplos adicionales de restos de emparejamiento de bases incluyen, de modo no taxativo, uracilo, timina, adenina, citosina, guanina e hipoxantina (inosina) que tienen sus grupos amino

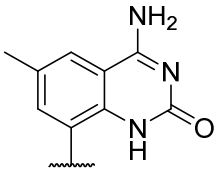
respectivos protegidos con grupos protectores de acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de pirimidina tales como pseudoisocitosina y pseudouracilo y otras nucleobases modificadas tales como purinas 8-sustituidas, xantina, o hipoxantina (las últimas dos son los productos de degradación natural). También se contemplan las nucleobases modificadas descritas en: Chiu y Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048; Limbach et ál. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196; y Revankar y Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313; cuyo contenido sse incorpora a la presente mediante referencia.

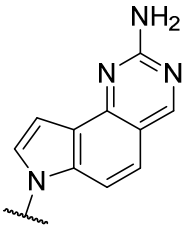
Los ejemplos adicionales de restos de emparejamiento de bases incluyen, de modo no taxativo, nucleobases de tamaño expandido en las cuales se ha agregado uno o más anillos de benceno. Los reemplazos de bases de ácido nucleico descritos en: el catálogo Glen Research (www.glenresearch.com); Krueger AT et ál., Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141-150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et ál., Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., et ál., Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723-733; y Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622-627; cuyo contenido se incorpora a la presente mediante referencia, se contemplan como útiles en los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido descritos en la presente. Los ejemplos de nucleobases de tamaño expandido incluyen las que se muestran a continuación, así como también formas tautoméricas de estas.

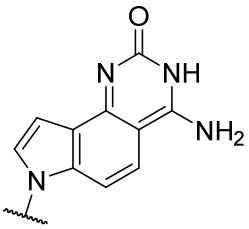


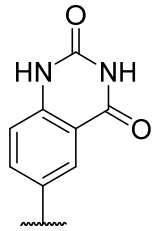


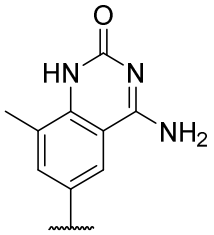


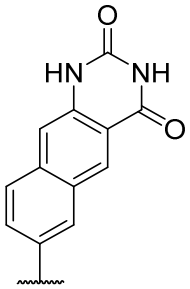


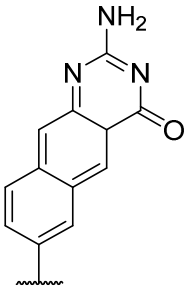












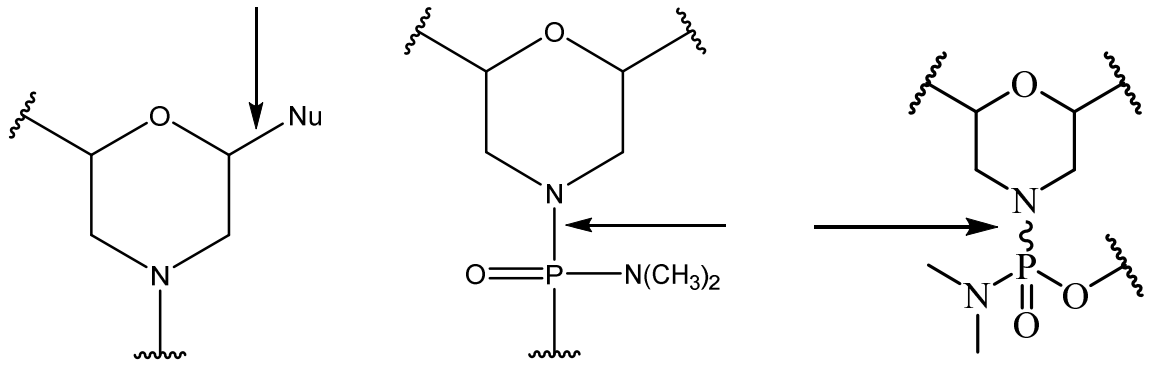
Las expresiones “administración parenteral” y “administrado/a por vía parenteral”, tal como se usan en la presente, significan modos de administración distintos a la administración entérica y tópica, usualmente por inyección, e incluyen, de modo no taxativo, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Por claridad, las estructuras de la descripción que incluyen, por ejemplo, la Fórmula (IV), son continuas a desde 5’ hasta 3’ y, por conveniencia de representación de la estructura completa en una forma compacta, se han incluido varias rupturas de ilustración etiquetadas como “RUPTURA A”, “RUPTURA B” y “RUPTURA C”. Como podría entender el experto en la técnica, por ejemplo, cada indicación de “RUPTURA A” muestra una continuación de la ilustración de la estructura en estos puntos. El experto entiende que lo mismo es correcto para cada aparición de “RUPTURA B” y “RUPTURA C” en las estructuras anteriores. Sin embargo, se pretende que ninguna de las rupturas de ilustración indique, o signifique para el experto en la técnica, una

interrupción real de la estructura anterior.

Tal como se usa en la presente, una serie de paréntesis usada dentro de una fórmula estructural indica que la característica estructural entre los paréntesis se repite. En algunas modalidades, los paréntesis usados pueden ser “[” y “]”, y en ciertas modalidades, los paréntesis usados para indicar características estructurales que se repiten pueden ser “(” y “)”. En algunas modalidades, el número de iteraciones repetidas de la característica estructural entre los paréntesis es el número indicado fuera de los paréntesis tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, y así sucesivamente. En varias modalidades, el número de iteraciones repetidas de la característica estructural entre los paréntesis está indicado por una variable indicada fuera de los paréntesis tal como “Z”.

Tal como se usa en la presente, un enlace recto o un enlace ondulado dibujado hacia un átomo de fósforo o carbono quiral dentro de una fórmula estructural, indica que la estereoquímica del fósforo o carbono quiral es indefinida y se pretende que incluya todas las formas del centro quiral y/o mezclas de estas. A continuación, se representan ejemplos de tales ilustraciones.



La expresión “farmacéuticamente aceptable” significa que la sustancia o composición debe ser compatible químicamente y/o toxicológicamente con los otros ingredientes que comprenden una formulación, y/o el sujeto que será tratado con esta.

La expresión “portador farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en la presente, significa un relleno, diluyente, material encapsulante, sólido, semisólido o líquido inerte, no tóxico, o

formulación auxiliar 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 de supositorio; 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 soya; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes amortiguadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógeno; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones amortiguadoras de fosfato; lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio; agentes colorantes; agentes de liberación; agentes de recubrimiento; agentes endulzantes; agentes saborizantes; agentes perfumantes; conservantes; y antioxidantes; de acuerdo con el criterio de quien elabora la formulación.

La expresión “restauración” con respecto a la síntesis o producción de distrofina se refiere generalmente a la producción de una proteína distrofina que incluye formas truncadas de distrofina en un paciente con distrofia muscular después del tratamiento con un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido descrito en la presente. En algunas modalidades, el tratamiento da como resultado un aumento en la nueva producción de distrofina en un paciente de 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 100 % (lo que incluye todos los números enteros intermedios). En algunas modalidades, el tratamiento aumenta la cantidad de fibras de distrofina positivas hasta al menos alrededor de 20 %, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, o de alrededor de 95 % a 100 % de lo normal en el sujeto. En otras modalidades, el tratamiento aumenta la cantidad de fibras de distrofina

positivas hasta de alrededor de 20 % a alrededor de 60 % o de alrededor de 30 % a alrededor de 50 % de lo normal en el sujeto. El porcentaje de fibras de distrofina positivas en un paciente después del tratamiento puede determinarse mediante una biopsia muscular mediante el uso de técnicas conocidas. Por ejemplo, una biopsia muscular tomarse de un músculo adecuado, tal como el músculo bíceps braquial en un paciente.

El análisis del porcentaje de fibras de distrofina positivas puede realizarse antes del tratamiento y/o después del tratamiento o en momentos durante el transcurso del tratamiento. En algunas modalidades, una biopsia después del tratamiento se toma del músculo contralateral de la biopsia antes del tratamiento. Los análisis de expresión de distrofina antes y después del tratamiento pueden ser realizados mediante el uso de cualquier ensayo adecuado para distrofina. En algunas modalidades, se realiza detección inmunohistoquímica en secciones de tejido de la biopsia muscular mediante el uso de 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.

En algunas modalidades, los porcentajes de fibras de distrofina positivas se calculan dividiendo la cantidad de fibras positivas entre el recuento total de fibras. Las muestras del músculo normal tienen 100 % de fibras de distrofina positivas. Por lo tanto, el porcentaje de fibras de distrofina positivas puede expresarse como un porcentaje de lo normal. Para controlar la presencia de niveles traza de distrofina en el músculo antes del tratamiento, así como también en las fibras revertientes, un valor inicial puede ajustarse mediante el uso de secciones de músculos de anteriores al tratamiento de un paciente cuando existe un recuento de fibras de distrofina positivas en los músculos después del tratamiento. Este puede utilizarse como un umbral para el recuento de fibras de distrofina positivas en secciones del músculo después del tratamiento en ese paciente. En otras modalidades, también pueden usarse secciones de tejido teñidas con

anticuerpo para la cuantificación de distrofina mediante el uso de software de análisis de imagen Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). La intensidad de señal de fluorescencia de distrofina total puede informarse como un porcentaje de lo normal. Además, puede usarse un análisis de transferencia Western con anticuerpos anti-distrofina monoclonales o policlonales para determinar el porcentaje de fibras de distrofina positivas. Por ejemplo, puede usarse el anticuerpo anti-distrofina NCL-Dys1 de Leica Biosystems. El porcentaje de fibras de distrofina positivas también puede analizarse mediante la determinación de la expresión de los componentes del complejo de sarcoglucano (β,γ) y/o NOS neuronal.

En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción disminuye o reduce la disfunción y/o insuficiencia muscular respiratoria progresiva en pacientes con DMD que podría esperarse sin tratamiento. En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido de la descripción puede reducir o eliminar la necesidad de asistencia de ventilación que podría esperarse sin tratamiento. En algunas modalidades, las mediciones de la función respiratoria para el seguimiento d el curso de la enfermedad, así como también la evaluación de intervenciones terapéuticas potenciales incluyen la presión inspiratoria máxima (MIP), presión espiratoria máxima (MEP), y capacidad vital forzada (FVC). La MIP y MEP miden el nivel de presión que una persona puede generar durante la inhalación y exhalación, respectivamente, y son medidas sensibles de fuerza muscular respiratoria. La MIP es una medida de la debilidad muscular del diafragma.

En algunas modalidades, la MEP puede disminuir ante cambios en otras pruebas de la función pulmonar, que incluyen MIP y FVC. En ciertas modalidades, la MEP puede ser un indicador temprano de la disfunción respiratoria. En ciertas modalidades, la FVC puede usarse para medir el volumen total de aire expulsado durante la exhalación forzada después de la inspiración máxima. En pacientes con DMD, la FVC aumenta concomitantemente con el crecimiento físico

hasta la adolescencia temprana. Sin embargo, a medida que el crecimiento se reduce o se atrofia por la evolución de la enfermedad, y la debilidad muscular progresa, la capacidad vital entra en una fase descendente y disminuye a una velocidad promedio de alrededor de 8 a 8.5 por ciento por año después de los 10 a 12 años de edad. En ciertas modalidades, el porcentaje previsto de MIP (MIP ajustada por peso), el porcentaje previsto de MEP (MEP ajustada por edad), y el porcentaje previsto de FVC (FVC ajustada por edad y altura) son análisis de apoyo.

Las expresiones “sujeto” y “paciente”, tal como se usan en la presente, incluyen cualquier animal que presenta un síntoma, o está en riesgo de presentar un síntoma, que puede tratarse con un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción, tal como un sujeto (o paciente) que tiene o está en riesgo de tener DMD o BMD, o cualquiera de los síntomas asociados con estas afecciones (por ejemplo, pérdida de fibra muscular). Los sujetos adecuados (o pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo, o cobayo), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos (o sujetos). También se incluyen métodos para producir distrofina en un sujeto (o paciente) que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 51.

Las expresiones “administración sistémica”, “administrado/a de forma sistémica”, “administración periférica” y “administrado/a de forma periférica”, tal como se usan en la presente, significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material distinto directamente en el sistema nervioso central, de manera que ingrese al sistema del paciente y, por lo tanto, se someta al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

La expresión “secuencia objetivo” se refiere a una secuencia de nucleobases de un oligómero que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en un pre-ARNm objetivo. En algunas modalidades de la descripción, la secuencia de nucleótidos en el pre-ARNm objetivo es un sitio

de hibridación en el exón 52 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24).

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 por alterar el curso natural del sujeto o célula. El tratamiento incluye, de modo no taxativo, la administración de un oligómero o una composición farmacéutica de este, y puede realizarse de forma profiláctica o después del inicio de un evento patológico o contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable en los síntomas o la patología de una enfermedad o afección asociada con la proteína distrofina, como en ciertas formas de distrofia muscular, y puede incluir, por ejemplo, cambios o mejoras mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se trata. También se incluyen los tratamientos “profilácticos”, que pueden estar dirigidos a reducir la velocidad de la evolución de la enfermedad o afección que se trata, retardar la aparición de esa enfermedad o afección, o reducir la gravedad de su aparición. “Tratamiento” o “profilaxis” no necesariamente indican la erradicación, cura o prevención completa de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados con estas.

En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción aumenta la nueva producción de distrofina, retarda la evolución de la enfermedad, ralentiza 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 mejora la regeneración muscular, que podrían esperarse sin tratamiento. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene, retarda o ralentiza la evolución de la enfermedad. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene la ambulación o reduce la pérdida de ambulación. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene la función pulmonar o reduce la pérdida de la función pulmonar. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de caminata estable en un paciente, según se mide, por ejemplo, mediante la Prueba Caminata de 6 Minutos (6MWT). En algunas modalidades, el tratamiento

mantiene o reduce el tiempo para caminar/correr 10 metros (es decir, la prueba de caminata/corrida de 10 metros). En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para pararse desde la posición supina (es decir, el tiempo de la prueba de pararse). En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para subir cuatro escalones estándar (es decir, la prueba de subir cuatro escalones). En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o reduce la inflamación muscular en el paciente, según se mide, por ejemplo, mediante MRI (por ejemplo, MRI de los músculos de la pierna). En algunas modalidades, la MRI mide T2 y/o la fracción de grasa para identificar la degeneración muscular. La MRI puede identificar cambios en la estructura y composición muscular causada por inflamación, edema, daño muscular, e infiltración de grasa.

En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción aumenta la nueva producción de distrofina y ralentiza o reduce la pérdida de ambulación que podría esperarse sin tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede estabilizar, mantener, mejorar o aumentar la capacidad para caminar (por ejemplo, estabilización de la ambulación) en el sujeto. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de caminata estable en un paciente, según se mide, por ejemplo, mediante la Prueba de Caminata de 6 Minutos (6MWT), descrita por McDonald, et ál. (Muscle Nerve, 2010; 42:966-74, incorporada a la presente mediante referencia). Un cambio en la Distancia de Caminata de 6 minutos (6MWD) puede expresarse como un valor absoluto, un cambio porcentual o un cambio en el % del valor previsto. En algunas modalidades, el tratamiento mantiene o mejora una distancia de caminata estable en una 6MWT de un 20 % de déficit en el sujeto con respecto a un compañero sano. El desempeño de un paciente con DMD en la 6MWT con respecto al desempeño típico de un compañero sano puede determinarse calculando un % del valor previsto. Por ejemplo, el % previsto de 6MWD puede calcularse mediante el uso de 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 % previsto de 6MWD puede calcularse mediante el uso de la siguiente ecuación: 188.61 + (51.50 x edad) – (1.86 x edad^2) + (86.10 x altura en metros) (Henricson et ál. PLoS Curr., 2012, versión 2, que se incorpora a la presente mediante referencia). En algunas modalidades, el tratamiento con un oligómero antisentido aumenta la distancia de caminata estable en el paciente desde el valor inicial hasta más de 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, o 50 metros (lo que incluye todos los números enteros intermedios).

La pérdida de la función muscular en pacientes con DMD puede producirse contra los antecedentes de crecimiento y desarrollo en la niñez normal. Sin embargo, niños más jóvenes con DMD pueden mostrar un aumento en la distancia caminada durante la 6MWT durante el transcurso de alrededor de 1 año a pesar del deterioro muscular progresivo. En algunas modalidades, la 6MWD de pacientes con DMD se compara con sujetos de control que se desarrollan de forma típica y datos normativos existentes de sujetos de la misma edad y sexo. En algunas modalidades, el crecimiento y desarrollo normal pueden representarse mediante el uso de una ecuación basada en la edad y altura ajustada a los datos normativos. Tal ecuación puede usarse para convertir la 6MWD a un valor de porcentaje previsto (% previsto) en sujetos con DMD. En ciertas modalidades, el análisis de los datos de % previsto de 6MWD representa un método para representar el crecimiento y desarrollo normal, y puede mostrar que las ganancias de función en edades tempranas (por ejemplo, a una edad menor o igual a 7 años) representan capacidades estables, en lugar de mejoras, en pacientes con DMD (Henricson et ál. PLoS Curr., 2012, versión 2, que se incorpora a la presente mediante referencia).

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

a continuación:

H#A/D(x:y).

La primera letra indica la especie (por ejemplo, H: humano, M: murino, C: canino). “#” indica el número de exón de distrofina objetivo. “A/D” indica el sitio de empalme donante o aceptor en el comienzo y la terminación del exón, respectivamente. (x y) representa las coordenadas de hibridación donde “-” o “+” indican las secuencias intrónicas o exónicas, respectivamente. Por ejemplo, A(-6+18) podría indicar las últimas 6 bases del intrón que precede el exón objetivo y las primeras 18 bases del exón objetivo. El sitio de empalme más cercano podría ser el aceptor, por lo tanto, estas coordenadas podrían ser precedidas con una “A”. La descripción de las coordenadas de hibridación en el sitio de empalme donante podría ser D(+2-18) donde las últimas 2 bases exónicas y las primeras 18 bases intrónicas corresponden al sitio de hibridación de la molécula antisentido. Las coordenadas de hibridación completamente exónicas podrían representarse mediante A(+65+85), que es el sitio entre el nucleótido 65 y 85 desde el inicio de ese exón.

II. <u>Oligómeros antisentido</u>

A. Oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido diseñados para inducir el salto del exón 52

En ciertas modalidades, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción son complementarios a una región objetivo del exón 52 del gen de distrofina e inducen el salto del exón 52. En particular, la descripción se refiere a oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido complementarios a una región objetivo del exón 52 del pre-ARNm de distrofina, indicada como un sitio de hibridación. En algunas modalidades, el sitio de hibridación es H52A(-01+24).

Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción se dirigen al

pre-ARNm de distrofina e inducen el salto del exón 52, de manera que se excluido o se salta en la transcripción de ARNm empalmado maduro. Al saltar el exón 52, el marco de lectura interrumpido se restaura en una mutación dentro del marco. Si bien la DMD está compuesta por varios subtipos genéticos, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción se diseñaron específicamente para saltar el exón 52 del pre-ARNm de distrofina. Las mutaciones de DMD susceptibles al salto del exón 52 comprenden un subgrupo de pacientes con DMD (8 %).

La secuencia de nucleobase de un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido que induce el salto del exón 52 está diseñada para ser complementaria a una secuencia objetivo específica dentro del exón 52 del pre-ARNm de distrofina. En algunas modalidades, un oligómero antisentido o un oligómero antisentido del conjugado de oligómero antisentido es un PMO, en donde cada anillo de morfolino del PMO está enlazado a una nucleobase que incluye, por ejemplo, las nucleobases que se encuentran en el ADN (adenina, citosina, guanina y timina).

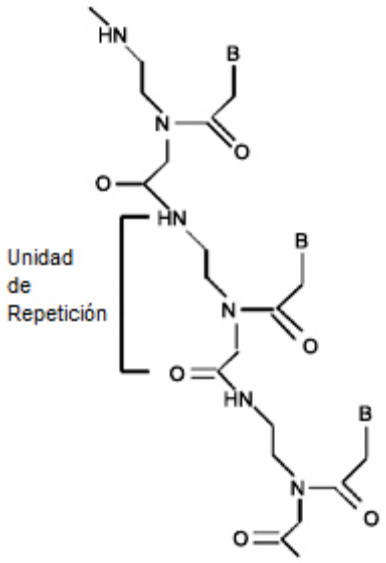
B. Características químicas de los oligómeros

Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción pueden emplear una variedad de químicas de oligómero antisentido. Los ejemplos de químicas de oligómero incluyen, de modo no taxativo, 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, oligómeros modificados con 2’-fluoro, ácidos nucleicos puenteados de 2'O,4'C-etileno (ENA), triciclo-ADN, subunidades de fosforotioato de triciclo-ADN, oligómeros modificados con 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etilo], lo que incluye combinaciones de cualquiera de los anteriores. Las químicas modificadas con fosforotioato y 2’-O-Me pueden combinarse para generar una

estructura principal de 2'O-Me-fosforotioato. Véase, por ejemplo, las publicaciones de PCT n.º WO/2013/112053 y WO/2009/008725, que se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia. A continuación, se describen adicionalmente las modalidades ilustrativas de químicas de oligómeros de la descripción.

1. Ácidos nucleicos peptídicos (PNA)

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) son análogos de ADN en los cuales la estructura principal es estructuralmente homomorfa con un estructura principal de desoxirribosa, que consiste de unidades de N-(2-aminoetil)glicina a las cuales se unen bases de pirimidina o purina. Los PNA que contienen bases de purina y pirimidina naturales se hibridan a oligómeros complementarios obedeciendo las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick, e imitando el ADN en términos de reconocimiento de pares de bases (Egholm, Buchardt et ál. 1993). La estructura principal de los PNA se forma mediante enlaces peptídicos en lugar de enlaces de fosfodiéster, lo que los hace adecuados para aplicaciones antisentido (véase la estructura a continuación). La estructura principal no tiene carga, lo que da resultado dúplex de PNA/ADN o PNA/ARN que presentan estabilidad térmica superior a la normal. Los PNA no son reconocidos por nucleasas o proteasas. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un PNA.



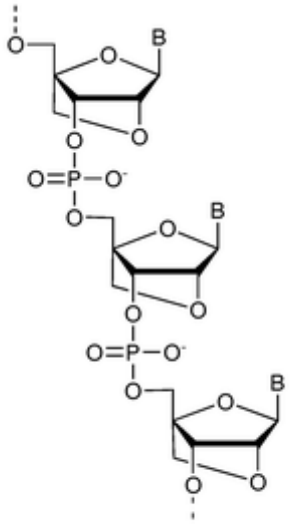
PNA

A pesar de un cambio estructural radical a la estructura natural, los PNA son capaces de unión específica de la secuencia en una forma de hélice a ADN o ARN. Las características de los PNA incluyen una gran afinidad de unión a ADN o ARN complementario, un efecto desestabilizante causado por un mal emparejamiento de bases individuales, resistencia a nucleasas y proteasas, hibridación con ADN o ARN independiente de la concentración de sal y formación de tríplex con ADN de homopurina. PANAGENE™ ha desarrollado sus monómeros de PNA de Bts patentados (Bts; grupo de benzotiazol-2-sulfonilo) y un proceso de oligomerización patentado. La oligomerización de PNA mediante el uso de monómeros de PNA de Bts está compuesta por ciclos repetitivos de desprotección, acoplamiento y formación de casquetes. Los PNA pueden producirse de forma sintética mediante el uso de cualquier técnica conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º: 6,969,766; 7,211,668; 7,022,851; 7,125,994; 7,145,006; y 7,179,896. Véase también las patentes de EE. UU. n.º: 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262 para la preparación de PNA. Indicaciones adicionales de compuestos de PNA se pueden encontrar en Nielsen et ál., Science, 254:1497-1500, 1991. Cada uno de los anteriores se incorporan en su totalidad mediante referencia.

2. Ácidos nucleicos bloqueados (LNA)

Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido también pueden contener subunidades de “ácidos nucleicos bloqueados” (LNA). Los “LNA” son un miembro de una clase de modificaciones denominadas ácido nucleico puenteado (BNA). El BNA se caracteriza por un enlace covalente que bloquea la conformación del anillo ribosa en un pliegue de azúcar C30-endo (northern). Para los LNA, el puente está compuesto de un metileno entre las posiciones 2’-O y 4’-C. El LNA mejora la preorganización de la estructura principal y el apilamiento de bases para aumentar la hibridación y la estabilidad térmica.

Las estructuras de los LNA se pueden encontrar, por ejemplo, en Wengel, et ál., Chemical Communications (1998) 455; Koshkin et ál., Tetrahedron (1998) 54:3607; Jesper Wengel, Accounts of Chem. Research (1999) 32:301; Obika, et ál., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; Obika, et ál., Tetrahedron Letters (1998) 39:5401; y Obika, et ál., Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230, que se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un LNA.

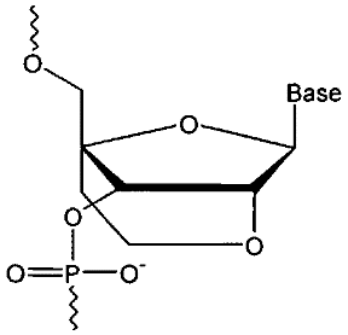


LNA

Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción pueden

incorporar uno o más LNA; en algunos casos, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido pueden estar completamente compuestos por LNA. Los métodos para la síntesis de subunidades de nucleósido de LNA individuales y su incorporación en los oligómeros se describen, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 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 en su totalidad mediante referencia. Los enlazadores entre subunidades típicos incluyen restos de fosfodiéster y fosforotioato; alternativamente, pueden emplearse enlazadores que no contienen fósforo. Las modalidades adicionales incluyen un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido que contiene LNA donde cada subunidad de LNA está separada por una subunidad de ADN. Ciertos oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido están compuestos por subunidades de LNA y ADN alternas donde el enlazador entre subunidades es fosforotioato.

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

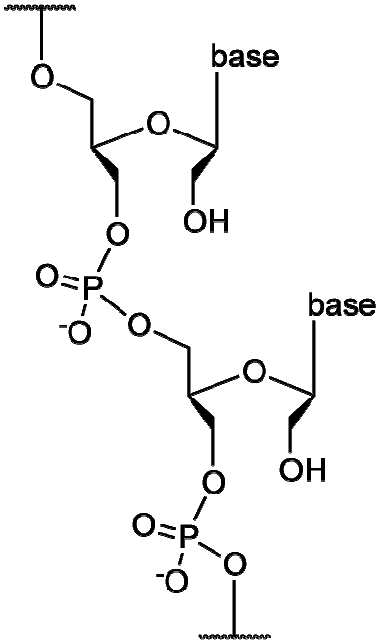


ENA

Los oligómeros de ENA y su preparación se describen en Obika et ál., *Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8735, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción pueden incorporar una o más subunidades ENA.

3. Ácido nucleico no bloqueado (UNA)

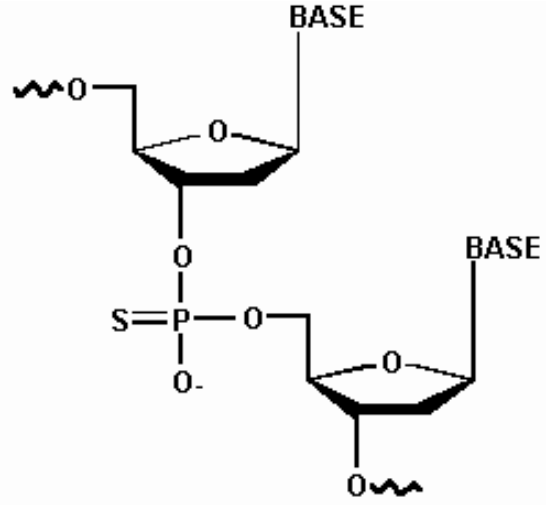
Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido también pueden contener subunidades de ácido nucleico no bloqueado (UNA). Los UNA y oligómeros de UNA son un análogo de ARN en el que se ha escindido el enlace C2′-C3' de la subunidad. Mientras que el LNA tiene una conformación restringida (con respecto al ADN y ARN), UNA es muy flexible. Los UNA se describen, por ejemplo, en WO 2016/070166. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un UNA.



Los enlazadores típicos entre subunidades incluyen restos de fosfodiéster y fosforotioato; alternativamente, pueden emplearse enlazadores que no contienen fósforo.

4. Fosforotioatos

Los “fosforotioatos” (o S-oligos) son una variante del ADN normal en la cual uno de los oxígenos que no forman el puente es reemplazado por un azufre. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un fosforotioato.



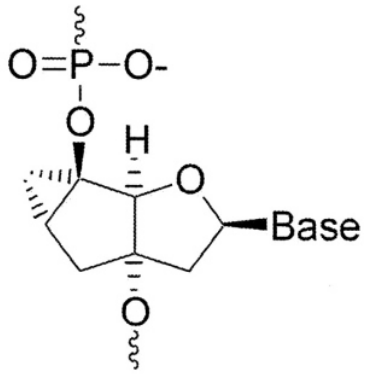
La sulfuración del enlace internucleótido reduce la acción de las endonucleasas y exonucleasas, que incluyen la exonucleasa POL 1 de ADN de 5' a 3' y de 3' a 5', las nucleasas S1 y P1, RNasas, nucleasas del suero y fosfodiesterasa de veneno de serpiente. Los fosforotioatos son elaborados por dos vías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

5. Subunidades de tricliclo-ADN y triciclo-fosforotioato

Los triciclo-ADN (tc-ADN) son una clase de análogos de ADN restringidos en los cuales cada nucleótido se modifica mediante la introducción de un anillo ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional de la estructura principal y optimizar la geometría de la estructura principal del ángulo de torsión γ. Los tc-ADNc homobásicos que contienen adenina y timina

forman pares de bases A-T extraordinariamente estables con ARN complementarios. Los triciclo-ADN y su síntesis se describen en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2010/115993, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción pueden incorporar una o más subunidades de triciclo-ADN; en algunos casos, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido pueden estar completamente compuestos por subunidades de triciclo-ADN.

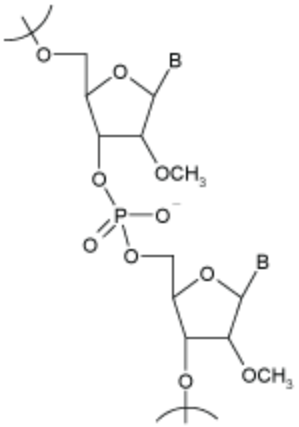
Las subunidades de triciclo-fosforotioato son subunidades de triciclo-ADN con enlaces de fosforotioato entre las subunidades. Las subunidades de triciclo-fosforotioato y su síntesis se describen en la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2013/053928, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción pueden incorporar una o más subunidades de triciclo-ADN; en algunos casos, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido pueden estar completamente compuestos por subunidades de triciclo-ADN. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de una subunidad de triciclo-ADN/triciclo-fosforotioato.



triciclo-ADN

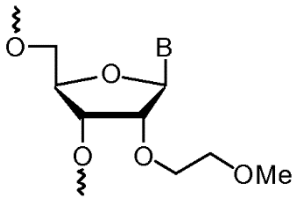
6. Oligómeros de 2’ O-Metilo, 2’ O-MOE y 2’-F

Las moléculas de “oligómeros de 2’-O-Me” presentan un grupo metilo en el residuo 2’-OH de la molécula de ribosa. Los 2’-O-Me-ARN muestran el mismo comportamiento (o similar) que el ADN, pero están protegidos contra la degradación de la nucleasa. Los 2’-O-Me-ARN también pueden combinarse con oligómeros de fosforotioato (PTO) para la estabilización adicional. Los oligómeros de 2’O-Me (fosfodiéster o fosfotioato) pueden sintetizarse de acuerdo con técnicas habituales en la técnica (véase, por ejemplo, Yoo et ál., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia). A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un oligómero de 2’ O-Me.



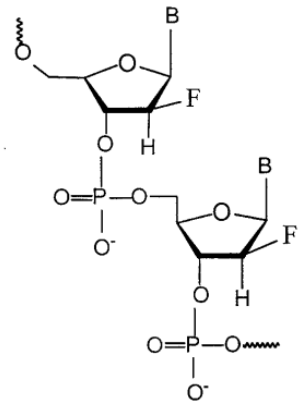
2’ O-Me

Los oligómeros de 2’ O-Metoxietilo (2’-O MOE) presentan un grupo metoxietilo en el residuo 2’-OH de la molécula de ribosa y se describen en Martin et ál., *Helv. Chim. Acta,* 78, 486-504, 1995, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de una subunidad de 2’O MOE.



MOE

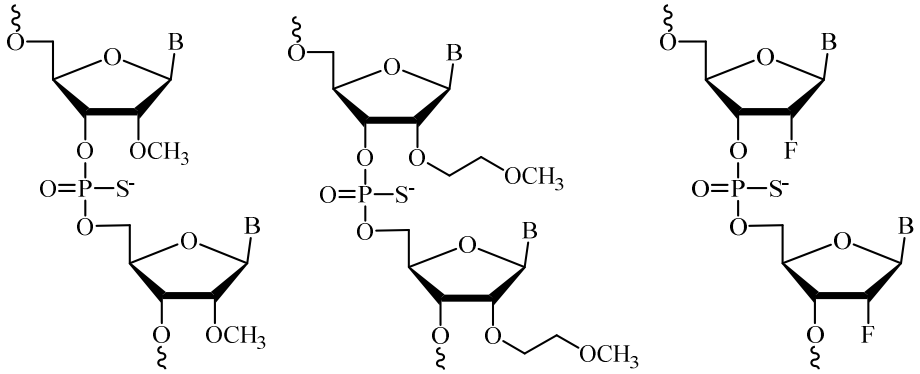
Los oligómeros de 2'-Fluoro (2'-F) tienen un radical fluoro en la posición 2' en lugar del 2'OH. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un oligómero de 2'-F.



2'-F

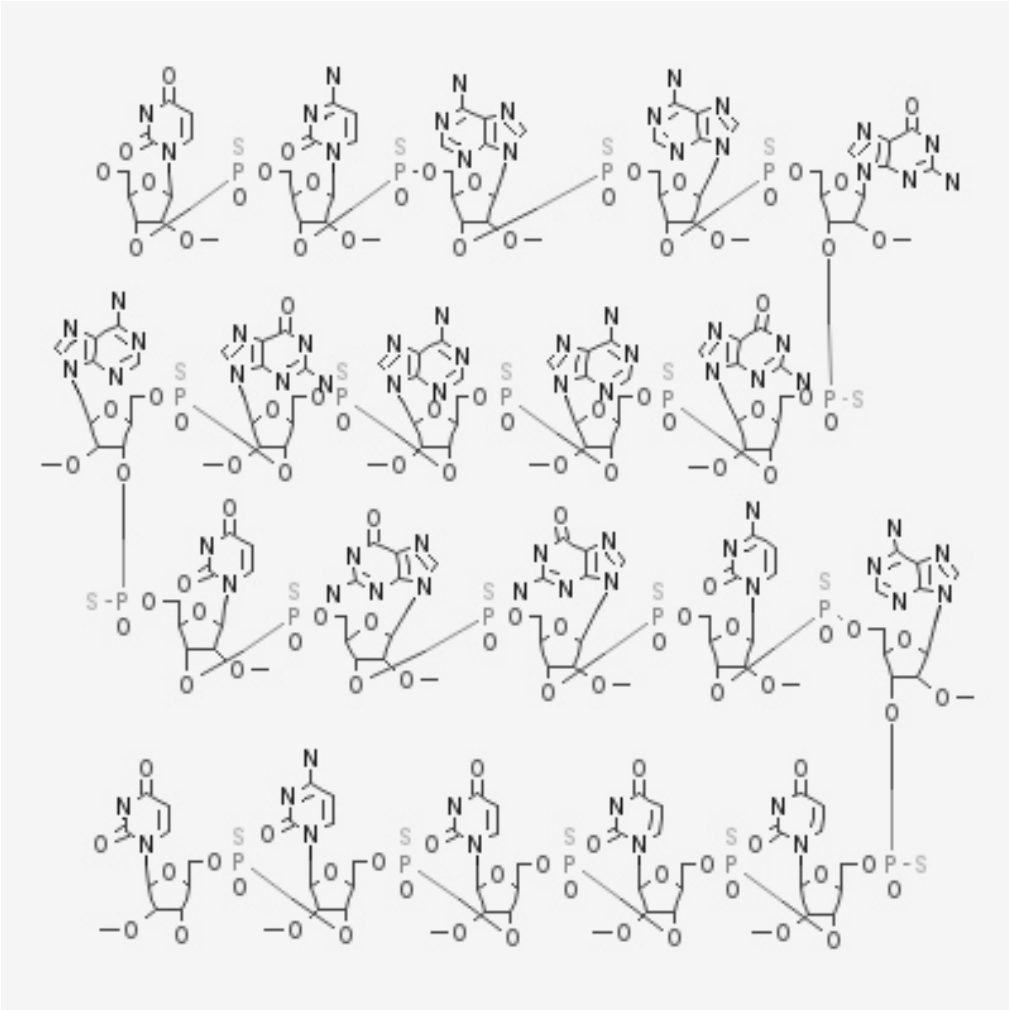
Los oligómeros de 2'-fluoro se describen, además, en WO 2004/043977, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

Los oligómeros de 2'O-Metilo, 2' O-MOE y 2'-F también pueden comprender uno o más enlaces de fosforotioato (PS), tal como se representa a continuación.

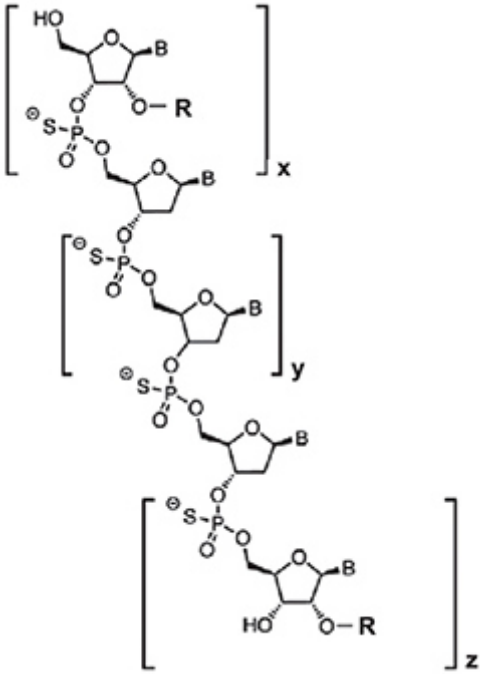


2'O-Metilo PS 2'O-MOE PS 2'-F PS

Adicionalmente, los oligómeros de 2'O-Metilo, 2' O-MOE, y 2'-F pueden comprender enlaces de PS entre subunidades a lo largo del oligómero, por ejemplo, como en el oligómero de PS de 2'O-metilo, drisapersen, que se representa a continuación.



Alternativamente, los oligómeros de 2’ O-Metilo, 2’ O-MOE y/o 2’-F pueden comprender enlaces de PS en los extremos del oligómero, como se representa a continuación.



donde:

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

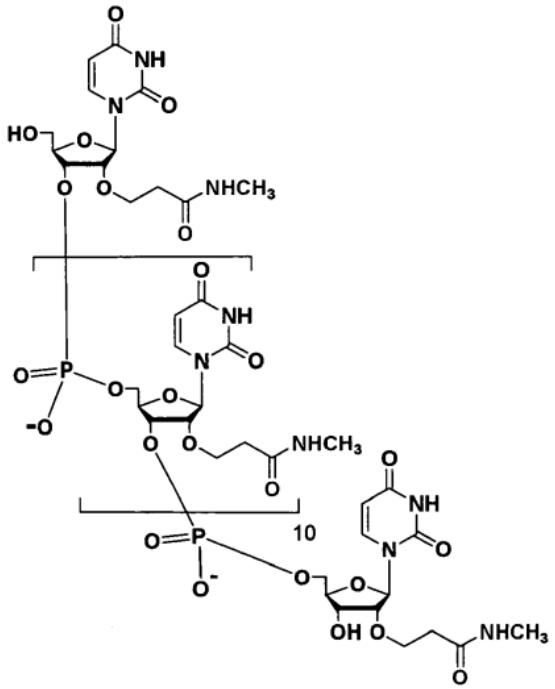
x, y, y z denotan el número de nucleótidos contenidos dentro de cada una de las regiones indicadas como ala 5’, hueco central, y ala 3’, respectivamente.

Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción 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 descritos aquí. En algunos casos, un oligómero antisentido y/o conjugado de oligómero antisentido de la descripción puede estar completamente compuesto por subunidades 2’O-Metilo, 2’ O-MOE o 2’-F. Una modalidad de un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción está compuesta completamente por subunidades de 2’O-metilo.

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

Los MCE son otro ejemplo de ribonucleósidos modificados con 2’O útiles en los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción. Aquí, el 2’OH deriva en un

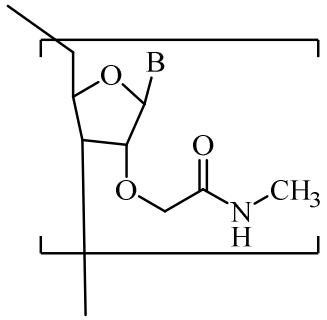
resto de 2-(N-metilcarbamoil)etilo para aumentar la resistencia de la nucleasa. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un oligómero de MCE.



MCE

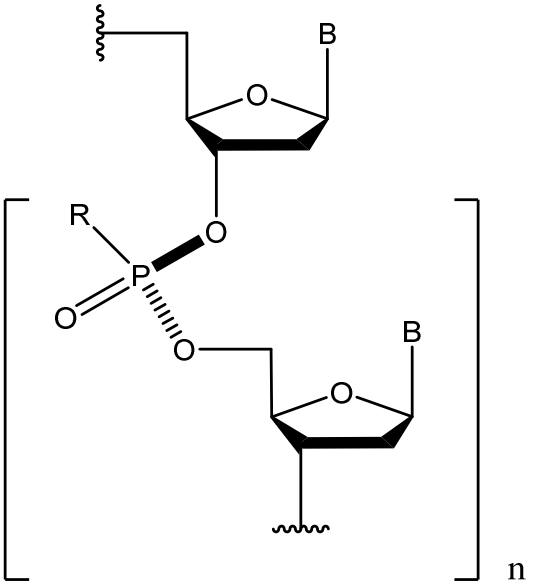
Los MCE y su síntesis se describen en Yamada et ál., *J. Org. Chem.* (2011) 76(9):3042-53, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción pueden incorporar una o más subunidades de MCE.

9. Oligómeros de 2'-O-NMA



9. Oligómeros estereoespecíficos

Los oligómeros estereoespecíficos son aquellos en los cuales la estereoquímica de cada enlace que contiene fósforo se fija mediante el método de síntesis, de manera que se produce un oligómero sustancialmente estereopuro. A continuación, se representa un ejemplo no taxativo de un oligómero estereoespecífico.



En el ejemplo anterior, cada fósforo del oligómero tiene la misma configuración estereo. Los ejemplos adicionales incluyen los oligómeros descritos anteriormente. Por ejemplo, los oligómeros basados en LNA, ENA, Triciclo-ADN, MCE, 2’ O-Metilo, 2’ O-MOE, 2’-F, y morfolino pueden prepararse con enlaces internucleósidos estereoespecíficos que contienen fósforo tales como, por ejemplo, fosforotioato, fosfodiéster, fosforamidato, fosforodiamidato, u otros enlaces internucleósidos que contienen fósforo. Los oligómeros estereoespecíficos, métodos de preparación, síntesis quiral controlada, diseño quiral, y auxiliares quirales para uso en la preparación de tales oligómeros se detallan, por ejemplo, en WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858, y WO2011005761, que se incorporan a la

presente en su totalidad mediante referencia.

Los oligómeros estereoespecíficos pueden tener enlaces internucleósidos que contienen fósforo en una configuración R_P o S_P. Los enlaces quirales que contienen fósforo en los cuales la configuración estereo de los enlaces está controlada se denominan “estereopuros”, mientras los enlaces quirales que contienen fósforo en los cuales la configuración estereo de los enlaces no está controlada se denominan “estereoaleatorios”. En ciertas modalidades, los oligómeros de la descripción comprenden múltiples enlaces etereopuros y estereoaleatorios, de manera que el oligómero resultante tenga subunidades estereopuras en posiciones del oligómero indicadas previamente. Un ejemplo de la ubicación de las subunidades estereopuras se proporciona en la publicación de solicitud de patente internacional número WO 2017/062862 A2 en las Figuras 7A y 7B. En una modalidad, todos los enlaces quirales que contienen fósforo en un oligómero son estereoaleatorios. En una modalidad, todos los enlaces quirales que contienen fósforo en un oligómero son estereopuros.

En una modalidad de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), todos los enlaces quirales que contienen fósforo en el oligómero son estereoaleatorios. En una modalidad de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), todos los enlaces quirales que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una modalidad de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos 10 % (con respecto al número entero más cercano) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una modalidad de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos 20 % (con respecto al número entero más cercano) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereopuros. En una modalidad de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), al menos 30 % (con respecto al número entero más cercano) de los

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

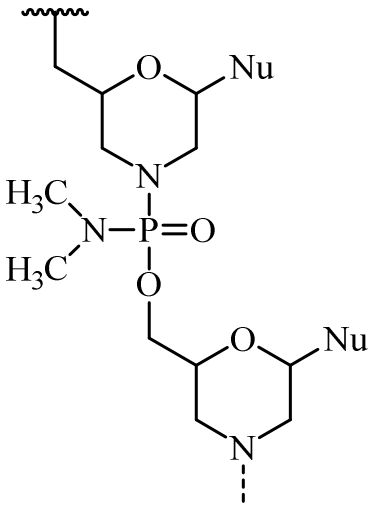
En una modalidad de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 2 enlaces estereopuros contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad de un oligómero con n enlaces quirales que contienen fósforo (donde n es un número entero de 1 o más), el oligómero contiene al menos 3 enlaces estereopuros contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P). En una modalidad 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 contiguos que contienen fósforo con la misma orientación estereo (es decir, S_P o R_P).

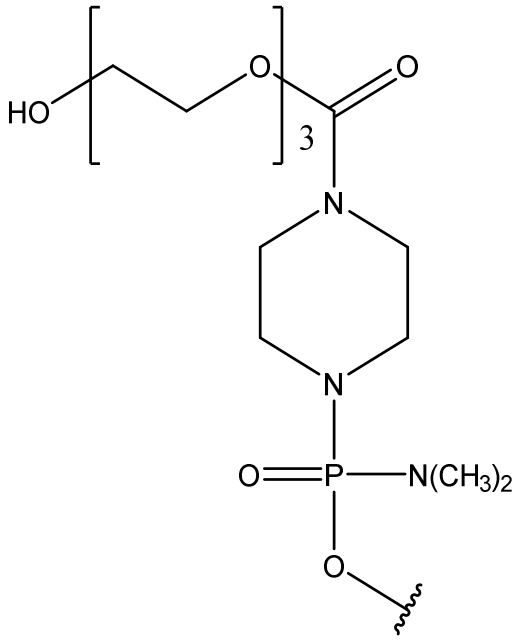
10. Oligómeros de morfolino

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

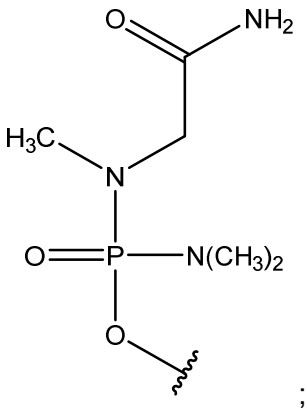


y como se describe en la Figura 2 de Summerton, J., et ál., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Tal como se describen en la presente, se pretende que los morfolinos cubran todos los estereoisómeros y tautómeros de la estructura general anterior. La síntesis, las estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las patentes de EE. UU. n.º: 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, que se incorporan a la presente mediante referencia.

En ciertas modalidades, un morfolino está conjugado con el extremo 5’ o 3’ del oligómero con un resto de “cola” para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas ilustrativas incluyen:



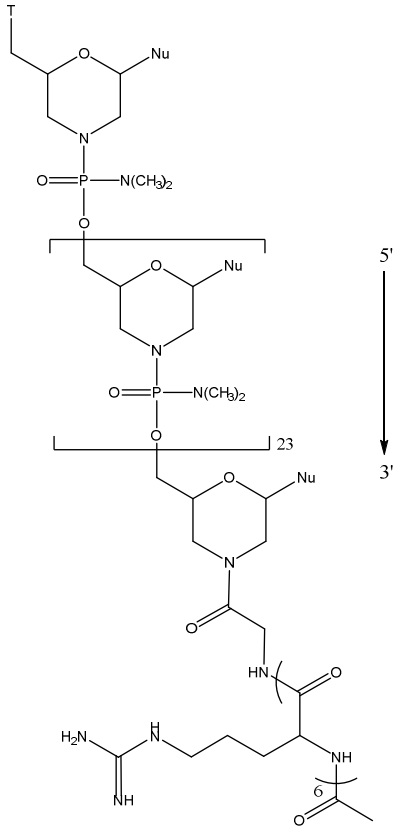
;



; y

.

En varias modalidades, un conjugado de oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (I):

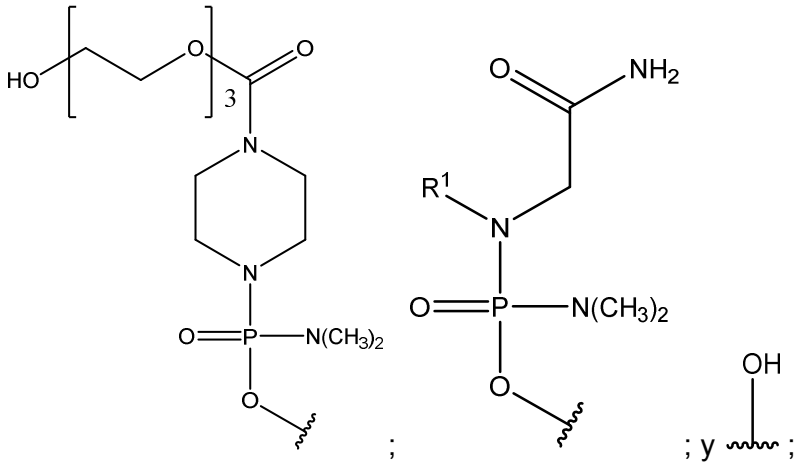


(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

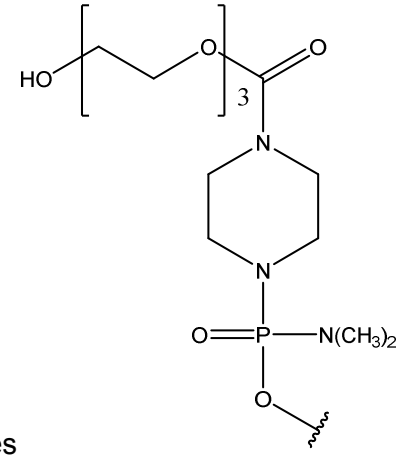
cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto forma una secuencia objetivo;

T es un resto seleccionado de:



R^1 es alquilo C_1-C_6;

en donde la secuencia objetivo es complementaria a un sitio de hibridación del exón 52 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24).

En varias modalidades, T es 

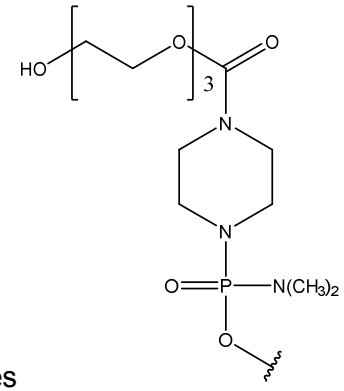
.

En varias modalidades, 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.

En algunas modalidades, un conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (I) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) de este. En ciertas modalidades, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

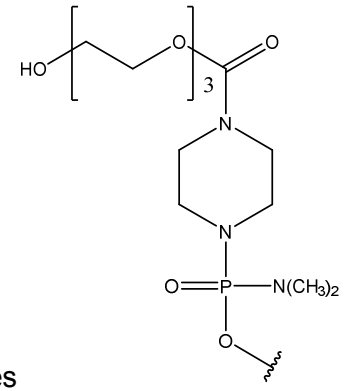
En algunas modalidades, cada Nu se selecciona de forma independiente de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U), e hipoxantina (I).

En algunas modalidades, la secuencia objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5'-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3'), en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U).

En varias modalidades, T es 

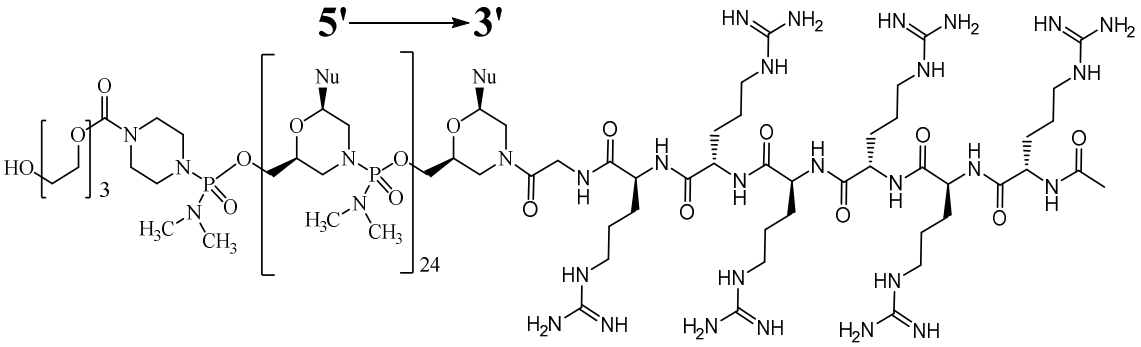
, y la secuencia objetivo es la SEQ ID NO:

1 (5’-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3’), en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U).

En varias modalidades, T es 

, y la secuencia objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5’-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3’).

En algunas modalidades, que incluyen, por ejemplo, algunas modalidades de la Fórmula (I), un conjugado de oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (II):



(II)

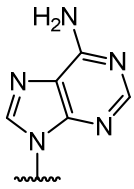
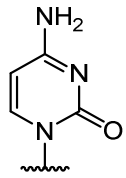
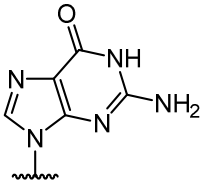
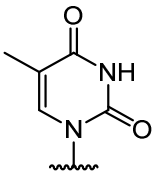
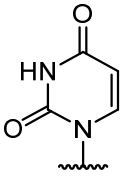
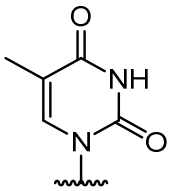
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto forma una secuencia objetivo que es complementaria a un sitio de hibridación del exón 52 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24).

En algunas modalidades, cada Nu se selecciona de forma independiente de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U), e hipoxantina (I).

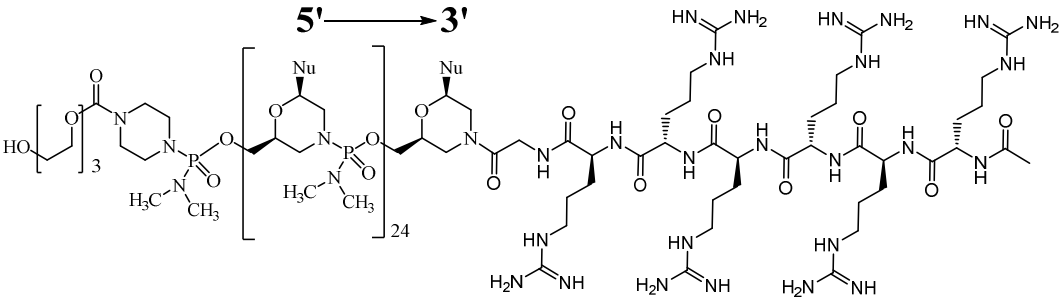
En varias modalidades, cada Nu de 1 a 25 y de 5’ a 3’ es (SEQ ID NO: 1):

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

en donde A es  , C es  , G es  , y X es  o  . En ciertas modalidades, cada X es de forma independiente  .

En algunas modalidades, un conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (II) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) de este. En ciertas modalidades, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

En algunas modalidades, que incluyen, por ejemplo, algunas modalidades de la Fórmula (II), un conjugado de oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (IIA):



(IIA)

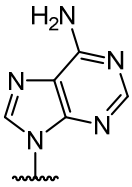
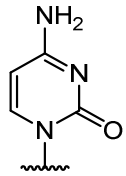
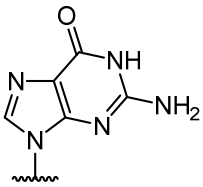
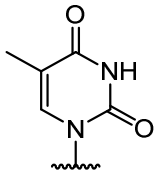
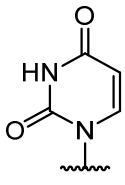
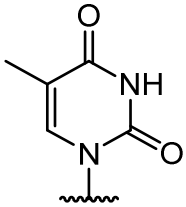
en donde cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto forma una secuencia objetivo que es complementaria a un sitio de hibridación del exón 52 en el pre-ARNm de distrofina,

indicado como H52A(-01+24).

En algunas modalidades, cada Nu se selecciona de forma independiente de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U), e hipoxantina (I).

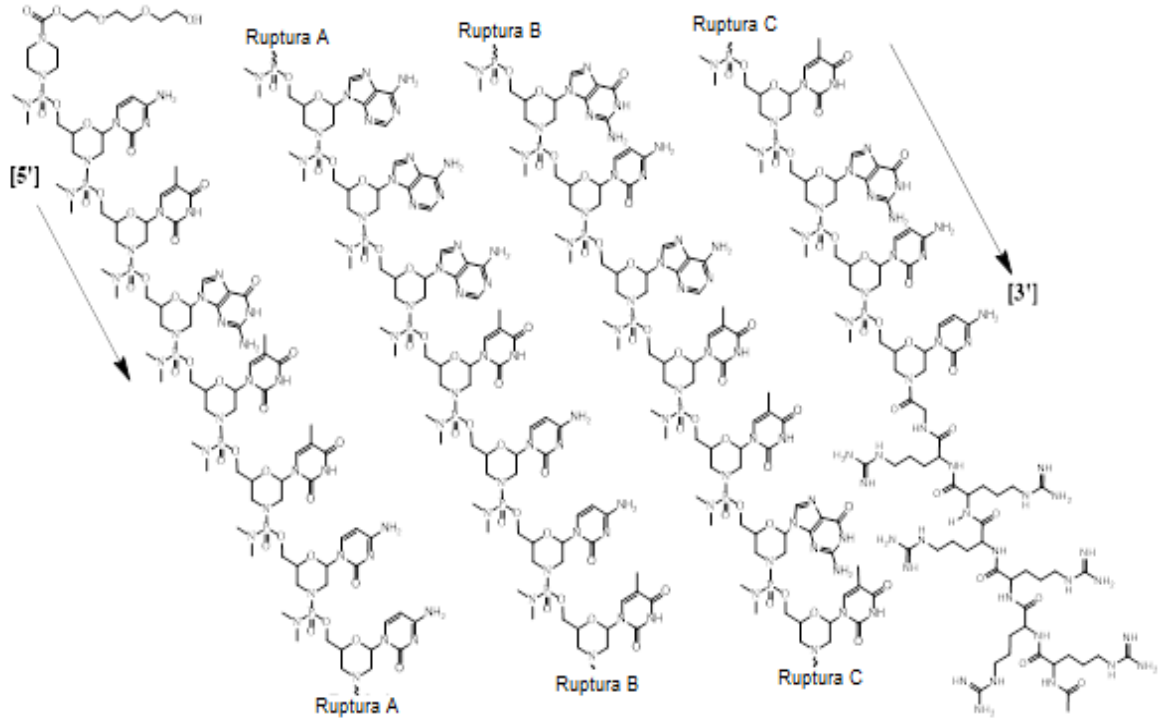
En varias modalidades, cada Nu de 1 a 25 y de 5’ a 3’ es (SEQ ID NO: 1):

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

en donde A es  , C es  , G es  , y X es  o  . En ciertas modalidades, cada X es  .

En algunas modalidades que incluyen, por ejemplo, modalidades de conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (II) y la Formula (IIA), la secuencia objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5’-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3’) en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U). En varias modalidades que incluyen, por ejemplo, modalidades de conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (II) y la Formula (IIA), la secuencia objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5’-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3’).

En algunas modalidades, que incluyen, por ejemplo, modalidades de conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (I), un conjugado de oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (III):

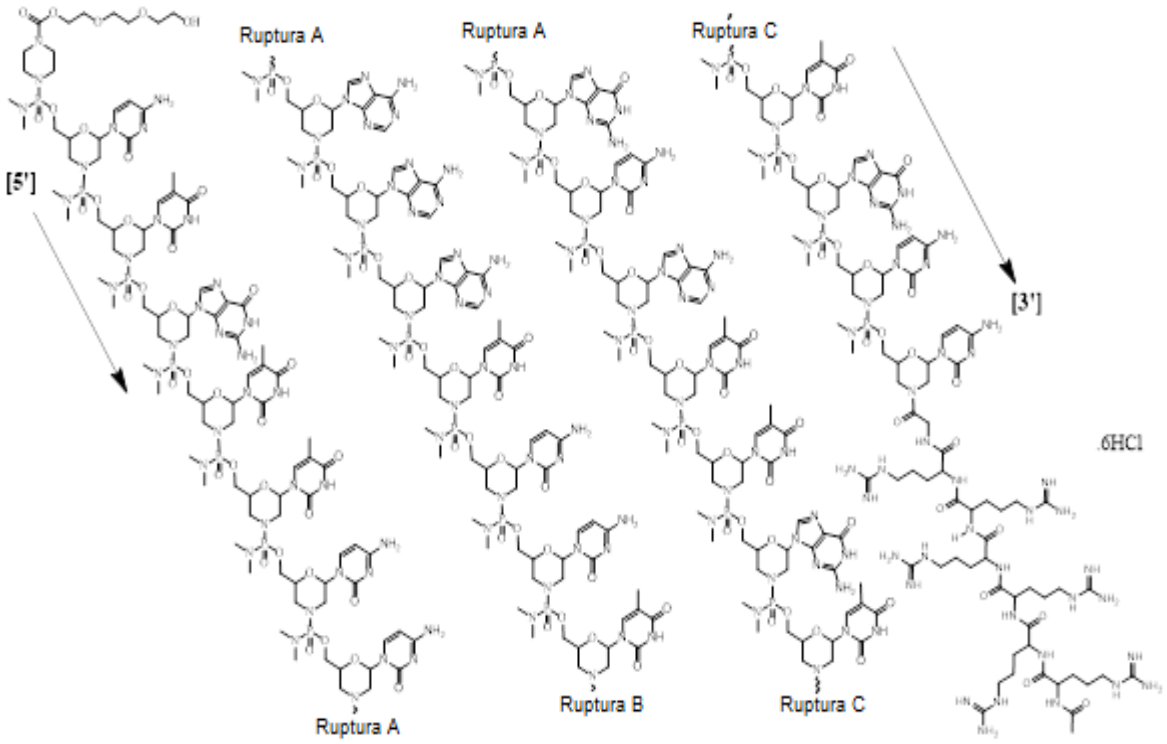


(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

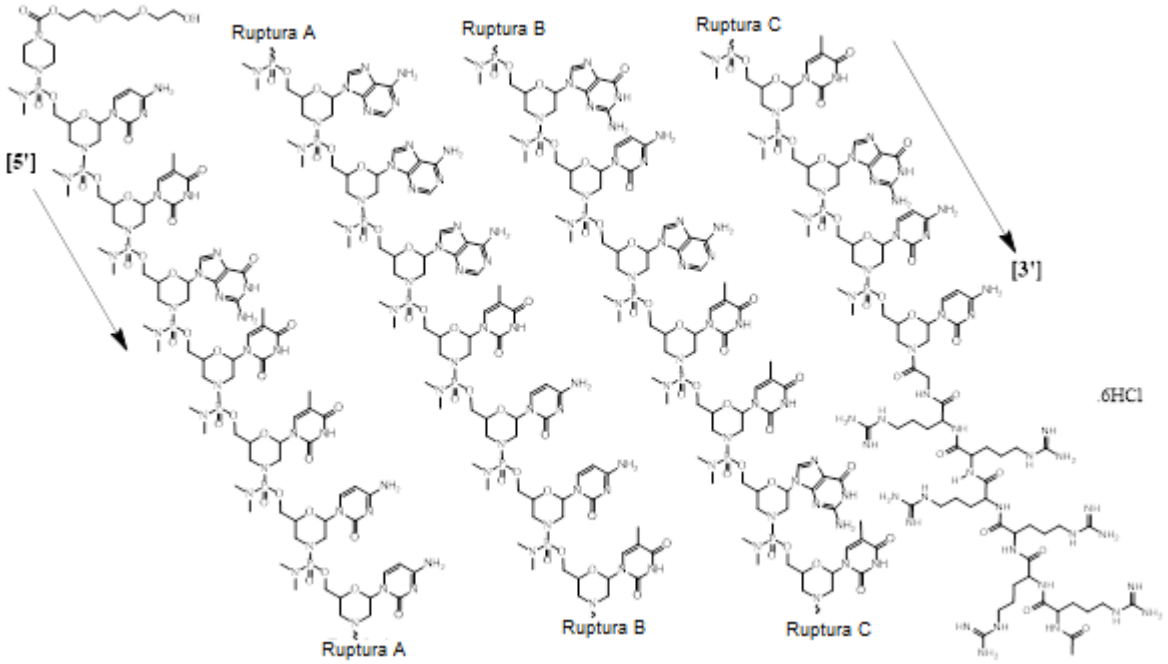
En algunas modalidades, un conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) de este. En ciertas modalidades, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

En algunas modalidades, que incluyen, por ejemplo, modalidades de conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (III), un conjugado de oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (IIIA):



(IIIA).

En algunas modalidades de la descripción, que incluyen algunas modalidades de conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (I) y modalidades de conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (III), el conjugado de oligómero antisentido está de acuerdo con la Fórmula (IV):

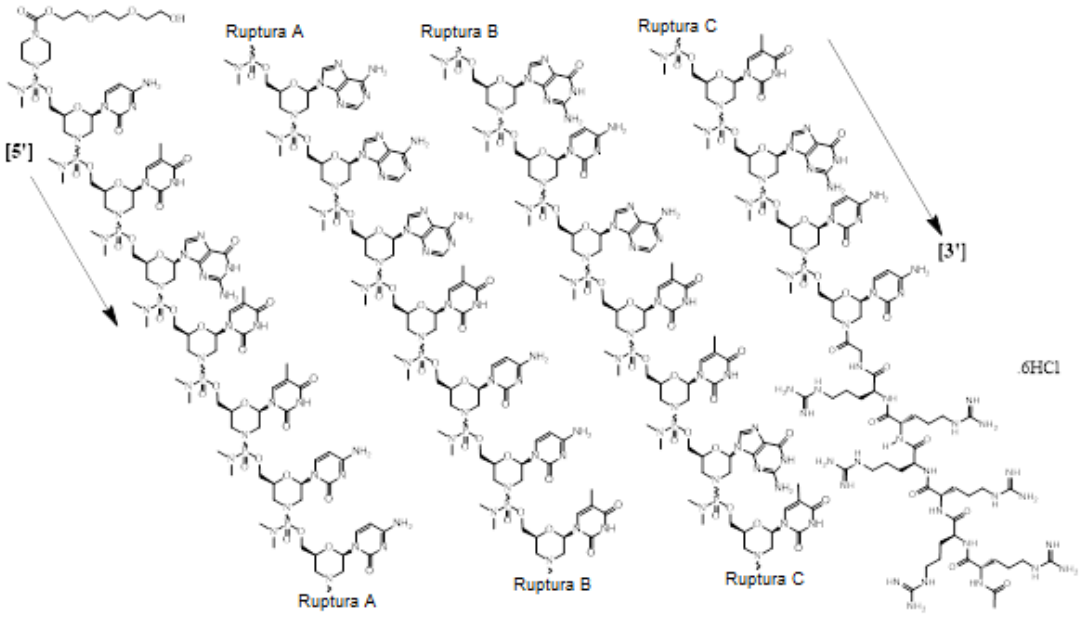


(IV)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

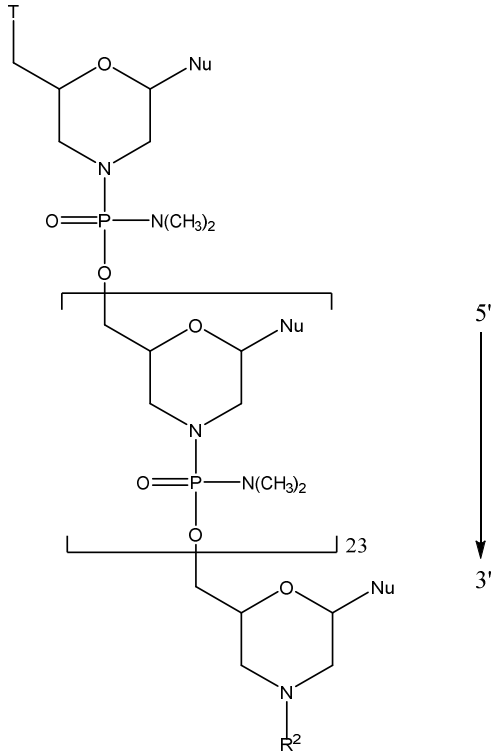
En algunas modalidades, un conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (IV) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) de este. En ciertas modalidades, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

En algunas modalidades, que incluyen, por ejemplo, modalidades de conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (IV), un conjugado de oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (IVA):



(IVA).

En varias modalidades, un oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (V):

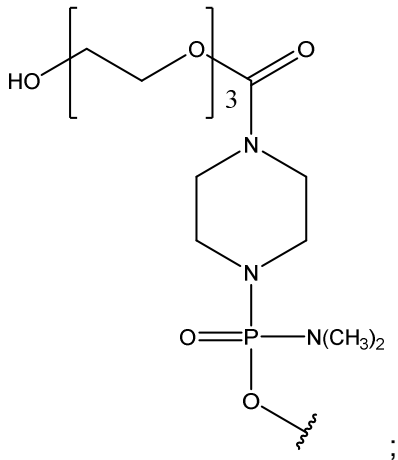


(V)

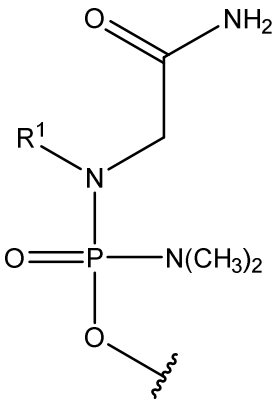
o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto forma una secuencia objetivo;

T es un resto seleccionado de:



;



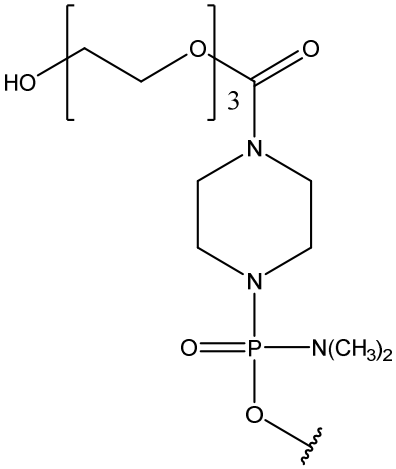
;

; y ;

R^1 es alquilo C_1-C_6; y

R^2 se selecciona de H o acetilo,

en donde la secuencia objetivo es complementaria a un sitio de hibridación del exón 52 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24).

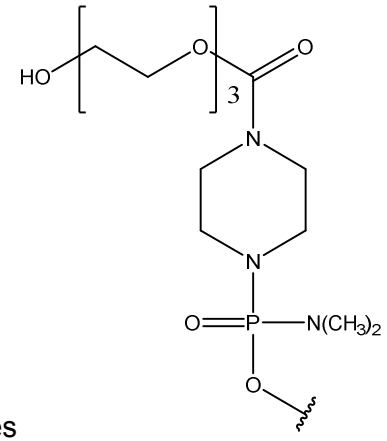
En varias modalidades, T es 

.

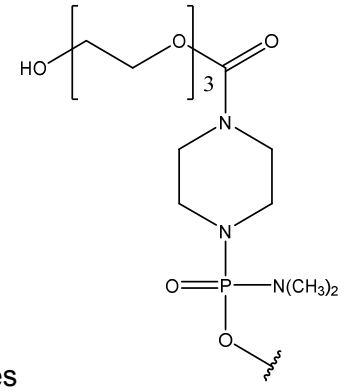
En varias modalidades, R^1 es metilo, CF_3, CCl_3, $CFCl_2$, CF_2Cl, etilo, CH_2CF_3, CF_2CF_3, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, t-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo, o 2,3-dimetilbutilo.

En algunas modalidades, cada Nu se selecciona de forma independiente de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U), e hipoxantina (I).

En algunas modalidades, la secuencia objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5'-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3'), en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U).

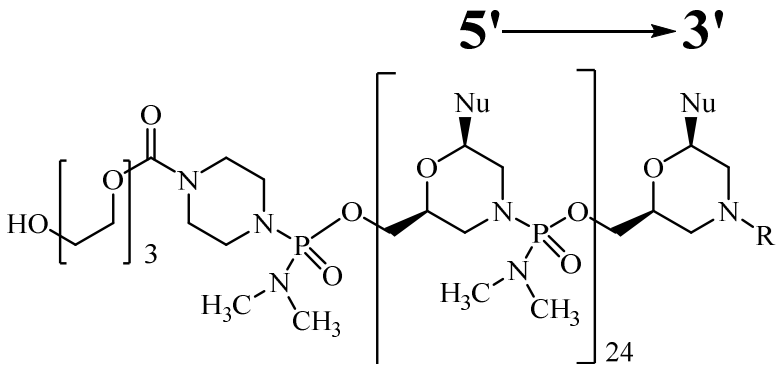


En varias modalidades, T es , y la secuencia objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5'-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3'), en donde cada timina (T) es opcionalmente uracilo (U).



En varias modalidades, T es , y la secuencia objetivo es la SEQ ID NO: 1 (5'-CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC-3').

En algunas modalidades, que incluyen, por ejemplo, algunas modalidades de la Fórmula (IV), un oligómero antisentido de la descripción está de acuerdo con la Fórmula (V):



(VI)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, en donde:

R se selecciona de H o acetilo; y

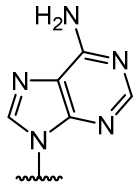
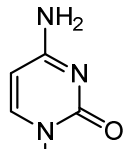
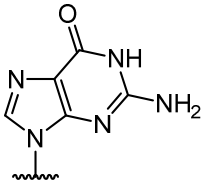
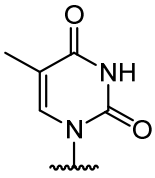
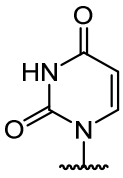
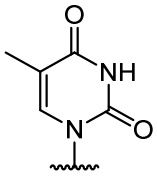
cada Nu es una nucleobase que tomada en conjunto forma una secuencia objetivo que es complementaria a un sitio de hibridación del exón 53 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24).

En algunas modalidades, R es H. En varias modalidades, R es acetilo.

En algunas modalidades, cada Nu se selecciona de forma independiente de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U), e hipoxantina (I).

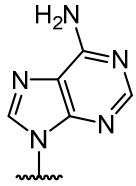
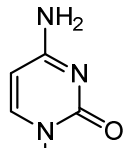
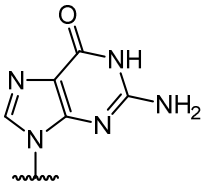
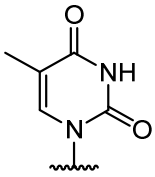
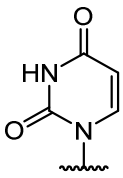
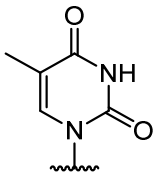
En varias modalidades, cada Nu de 1 a 25 y de 5' a 3' es (SEQ ID NO: 1):

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

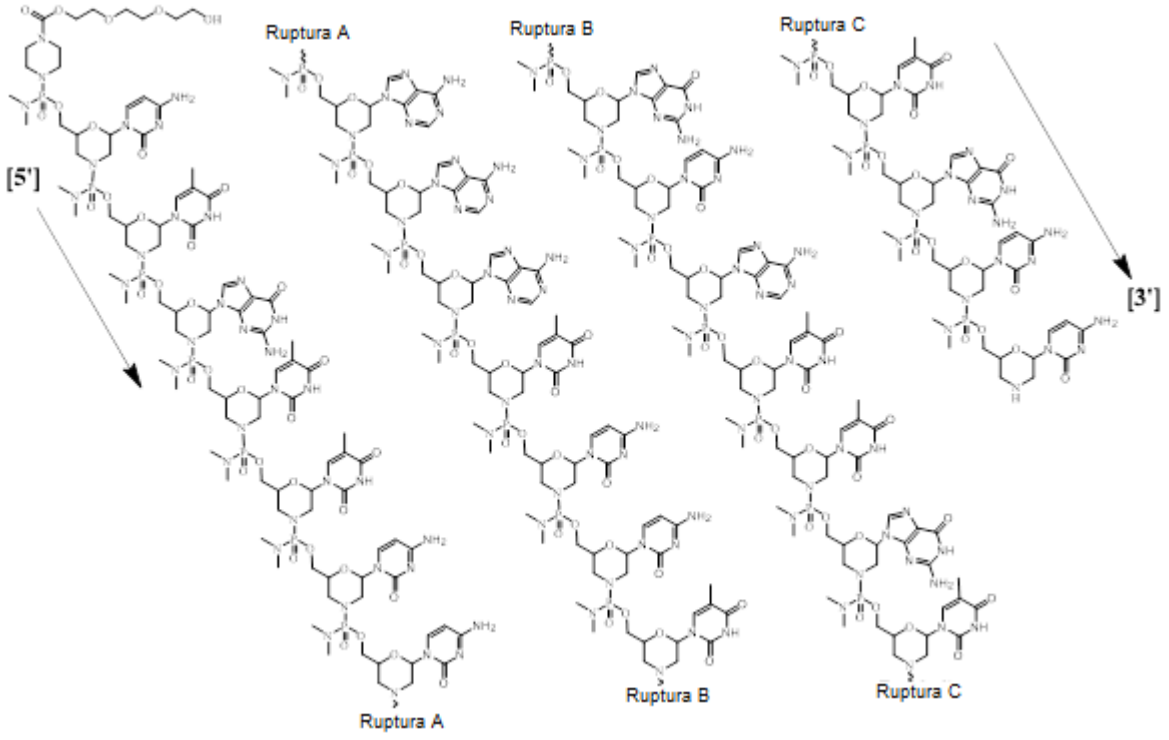
en donde A es  , C es  , G es  , y X es  o  . En ciertas modalidades, cada X es de forma independiente  .

En varias modalidades, R es H y cada Nu de 1 a 25 y de 5' a 3' es (SEQ ID NO: 1):

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

en donde A es  , C es  , G es  , y X es  o  . En ciertas modalidades, cada X es de forma independiente  .

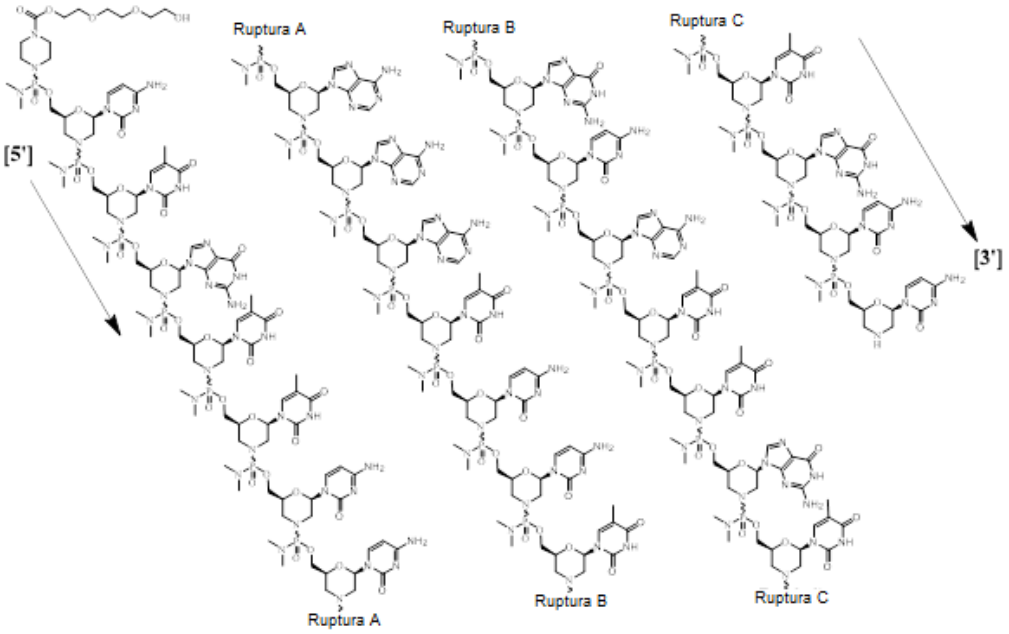
En algunas modalidades de la descripción, que incluyen algunas modalidades de oligómeros antisentido de la Formula (V) y modalidades de oligómeros antisentido de la Formula (VI), el oligómero antisentido está de acuerdo con la Fórmula (VII):



(VII)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En otro aspecto, la descripción proporciona conjugados de oligómero antisentido de la Fórmula (VIIA):



(VIIA)

o una sal farmacéuticamente aceptable de estos.

10. Modificaciones y sustituciones de nucleobases

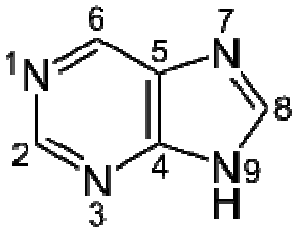
En ciertas modalidades, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción están compuestos por nucleobases de ARN y nucleobases de ADN (a menudo denominadas en la técnica simplemente como “base”). Las bases de ARN son comúnmente conocidas como adenina (A), uracilo (U), citosina (C) y guanina (G). Las bases de ADN son comúnmente conocidas como adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). En varias modalidades, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción están compuestos por citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U), e hipoxantina (I).

En algunas modalidades, un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la descripción comprende una secuencia de nucleobases que tomadas en conjunto forman una secuencia objetivo en donde la secuencia objetivo es complementaria a un sitio de hibridación

del exón 52 en el pre-ARNm de distrofina, indicado como H52A(-01+24). En varias modalidades, la secuencia de nucleobases comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, la secuencia de nucleobases consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1. En varias modalidades, la secuencia de nucleobases comprende una secuencia que tiene eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleobases en la secuencia de la SEQ ID NO:1. En varias modalidades, la secuencia de nucleobases consiste en una secuencia que tiene eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleobases en la secuencia de la SEQ ID NO:1. En varias modalidades, la secuencia objetivo tiene una región complementaria con al menos una cadena 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 objetivo y la al menos una nucleobase adicional no tiene nucleobase complementaria en la región de la secuencia objetivo, y en donde la región objetivo complementaria con la al menos una cadena de tres o más nucleobases contiguas idénticas es interna a la secuencia objetivo, cuyos ejemplos se pueden encontrar en la patente de EE. UU. serie n.º 62/573,985, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

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

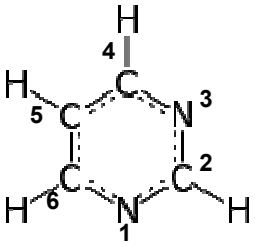
Las bases de purina comprenden un anillo pirimidina fusionado a un anillo imidazol, como se describe mediante la siguiente fórmula general.



Purina

La adenina y la guanina son las dos nucleobases de purina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos. Otras purinas de origen natural incluyen, de modo no taxativo, N^6-metiladenina, N^2-metilguanina, hipoxantina, y 7-metilguanina.

Las bases de pirimidina comprenden un anillo pirimidina de seis miembros, como se describe mediante la siguiente fórmula general.



Pirimidina

La citosina, el uracilo y la timina son las bases de pirimidina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos. Otras pirimidinas de origen natural incluyen, de modo no taxativo, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, pseudouracilo, y 4-tiouracilo. En una modalidad, los oligómeros descritos en la presente contienen bases de timina en lugar de uracilo.

Otras bases adecuadas incluyen, de modo no taxativo: 2,6-diaminopurina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidinas (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), sujeción 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 estos; N^2-ciclopentilguanina (cPent-G), N^2-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP), y N^2-propil-2-aminopurina (Pr-AP), pseudouracilo, o derivados de estos; y bases degeneradas o universales, como 2,6-difluorotolueno o bases ausentes como sitios abásicos (por ejemplo, 1-desoxirribosa, 1,2-didesoxirribosa, l-desoxi-2-O-metilribosa; o derivados de pirrolidina en los cuales el oxígeno del anillo se ha reemplazado con nitrógeno (azarribosa)). Los ejemplos de derivados de Súper A, Súper G, y Súper T se pueden encontrar en la patente de EE. UU. 6,683,173 (Epoch Biosciences), que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. Se demostró que cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducen los efectos inmunoestimuladores cuando se incorporan en el ARNip (Peacock H. et ál. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9200). El pseudouracilo es una versión isomerizada de uracilo de origen natural, con un C-glicósido en lugar del N-glicósido regular como en la uridina. El ARNm sintético que contiene pseudouridina puede tener un perfil de seguridad mejorado en comparación con el mPvNA que contiene uridina (WO 2009127230, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia).

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

11. Sales farmacéuticamente aceptables de oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido

Ciertas modalidades de oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido descritos en la presente pueden contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” en este sentido, se refiere a las sales de adición de ácido orgánicas e inorgánicas relativamente no tóxicas de oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción. Estas sales pueden preparase *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o por separado al hacer reaccionar un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido purificado de la descripción en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y al aislar la sal formada de ese 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 ál. (1977) “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66:1-19).

Las sales farmacéuticamente aceptables de los oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido de la presente incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los oligómeros antisentido o 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 ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como ácido 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.

En ciertas modalidades, los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” en estos casos se refiere a las sales de adición de base inorgánicas y orgánicas relativamente no tóxicas de oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción. Estas sales pueden, del mismo modo, prepararse *in situ* en el vehículo de administración o el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o por separado al hacer reaccionar el oligómero antisentido o 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 amoníaco, 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 sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et ál., *supra*).

III. <u>Formulaciones y modos de administración</u>

En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona formulaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro terapéutico de oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido, como se describe en la presente. Por lo tanto, en ciertas modalidades, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los oligómeros antisentido

o uno o más de los conjugados de oligómero antisentido descritos en la presente, formulados junto con uno o más portadores (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Si bien es posible que un oligómero antisentido y/o conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción se administren solos, se prefiere administrar el oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido como una formulación farmacéutica (composición). En una modalidad, el oligómero antisentido o el conjugado de oligómero antisentido de la formulación está de acuerdo con la Fórmula (III) o la Fórmula (VII), respectivamente.

Los métodos para el suministro de moléculas de ácido nucleico, que pueden aplicarse a los oligómeros antisentido o los conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción, se describen, por ejemplo, en: Akhtar et ál., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; y Sullivan et ál., PCT WO 94/02595. Estos y otros protocolos pueden ser utilizados para el suministro de virtualmente cualquier molécula de ácido nucleico, que incluye los oligómeros antisentido y los conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden formularse específicamente para administración en forma sólida o líquida, lo que incluye aquellas adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pócimas (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos (dirigidos para absorción bucal, sublingual o sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, ungüento, o un parche o atomizador de liberación controlada aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema, o espuma; (5) sublingual; (6) ocular; (7) transdérmica; o (8) nasal.

Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente

aceptables incluyen, de modo no taxativo: (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 supositorio; (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 soya; (10) glicoles, tales como propilenglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como acetato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógeno; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones con pH amortiguado; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Los ejemplos no taxativos adicionales de agentes adecuados para su formulación con los oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG; ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos; ácidos nucleicos que contienen restos lipofílicos; fosforotioatos; inhibidores de la glicoproteína-P (tales como Pluronic P85), que pueden mejorar el ingreso de fármacos en varios tejidos; polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(D,L-láctido-coglicólido) para el suministro de liberación sostenida después del implante (Emerich, D F et ál., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas, tales como aquellas elaboradas con polibutilcianoacrilato, que pueden suministrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de absorción neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

La descripción también presenta el uso de la composición que comprende liposomas modificados en la superficie que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (“PEG”) (liposomas

modificados con PEG, ramificados y no ramificados, o combinaciones de estos, o liposomas de circulación prolongada o liposomas poco detectables). Los oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido de la descripción también pueden comprender moléculas de PEG unidas covalentemente de varios pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos objetivo. Esta clase de portadores de fármacos resisten la opsonización y eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), permitiendo de ese modo tiempos de circulación en sangre más prolongados y una exposición mejorada de los tejidos para el fármaco encapsulado (Lasic et ál. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et ál., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Se ha demostrado que tales liposomas se acumulan selectivamente en los tumores, presumiblemente, por extravasación y captura en los tejidos objetivo neovascularizados (Lasic et ál., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et ál., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Los liposomas de circulación prolongada mejoran la farmacocinética y farmacodinámica del ADN y ARN, particularmente, en comparación con liposomas catiónicos convencionales que se conocen por acumularse en los tejidos del MPS (Liu et ál., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et ál., publicación internacional de PCT n.º WO 96/10391; Ansell et ál., publicación internacional de PCT n.º WO 96/10390; Holland et ál., publicación internacional de PCT n.º WO 96/10392). También es probable que los liposomas de circulación prolongada protejan los fármacos contra la degradación de nucleasas en mayor medida, en comparación con los liposomas catiónicos, en función de su capacidad para evitar la acumulación en los tejidos de MPS metabólicamente agresivos tales como el hígado y el bazo.

En una modalidad adicional, la presente descripción incluye composiciones farmacéuticas de oligómeros antisentido y composiciones farmacéuticas de conjugados de oligómero antisentido preparadas para su suministro como se describe en las patentes de EE. UU. n.º: 6,692,911; 7,163,695; y 7,070,807. En este sentido, en una modalidad, la presente descripción proporciona

un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción en una composición que comprende copolímeros de lisina e histidina (HK) (como se describe en las patentes de EE. UU.n.º: 7,163,695; 7,070,807; y 6,692,911) ya sea solos o 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 modalidades, la presente descripción proporciona oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido en composiciones farmacéuticas que comprenden polilisina-transferrina/polihistidina gluconilada o polihistidina modificada con ácido glucónico. Un experto en la técnica también reconocerá que los aminoácidos con propiedades similares a His y Lys pueden sustituirse dentro de la composición. En las composiciones también pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes (tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio), agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes endulzantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

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, tal como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes de metal, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Las formulaciones de la presente descripción incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden ser presentarse de forma conveniente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de farmacia. La

cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto a tratar y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única generalmente será aquella cantidad del ingrediente activo que produce un efecto terapéutico. Generalmente, esta cantidad variará de alrededor de 0.1 por ciento a alrededor de noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente, de alrededor de 5 por ciento a alrededor de 70 por ciento, muy preferentemente, de alrededor de 10 por ciento a alrededor de 30 por ciento.

En ciertas modalidades, una formulación de la presente descripción comprende un excipiente seleccionado de ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes que forman micelas, por ejemplo, ácidos biliares, y portadores poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción. En una modalidad, el conjugado de oligómero antisentido de la formulación está de acuerdo con la Fórmula (III). En una modalidad, el oligómero antisentido de la formulación está de acuerdo con la Fórmula (VII). En ciertas modalidades, una formulación mencionada anteriormente vuelve oralmente biodisponible un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción.

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

Las formulaciones de la descripción adecuados para administración oral pueden tener forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, grageas (mediante el uso de una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una

suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elíxir o jarabe, o como pastillas (mediante el uso de una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, donde cada uno contiene una cantidad predeterminada de un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción como un ingrediente activo. Un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción también puede administrarse como un bolo, electuario, o pasta.

En las formas de dosificación sólidas de la descripción para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, pastillas y similares), el ingrediente activo puede mezclarse con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes que retardan la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y tensoactivos, tales como poloxámero y laurilsulfato de sodio; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol, y tensoactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, estearato de zinc, estearato de sodio, ácido esteárico, y mezclas de estos; (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 amortiguadores. Las composiciones farmacéuticas sólidas de un tipo similar también pueden

ser empleadas como rellenos en cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda mediante el uso de excipientes tales como lactosa o azúcares de leche, así como también polietilenglicoles de alto peso molecular, y similares.

Un comprimido puede elaborase mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos elaborados mediante compresión pueden prepararse mediante el uso de aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón de sodio o carboximeticelulosa de sodio reticulada), agente dispersante o tensoactivo. Los comprimidos moldeados pueden elaborarse mediante moldeado en una máquina adecuada de una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente pueden marcarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También pueden formularse para proporcionar liberación lenta o controlada del ingrediente activo en estas, por ejemplo, mediante el uso de 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, para secado por congelación. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias, o mediante incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes del uso. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden tener una composición tal que puedan liberar los ingredientes activos solamente, o preferentemente, en una cierta parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones

incluidas que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El ingrediente activo también puede estar en forma microencapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

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

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

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de estos.

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

el recto o la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

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

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

Los parches transdérmicos tienen la ventaja agregada de proporcionar un suministro controlado de un conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción al cuerpo. Tales formas de dosificación pueden elaborarse mediante la disolución o dispersión del 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 al proporcionar una membrana que controla la velocidad o al dispersar el agente en una matriz polimérica o gel, entre otros métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más conjugados de oligómero de la descripción en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas

estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles, que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, amortiguadores, agentes bacteriostáticos, solutos que vuelven isotónica la formulación con la sangre del receptor de destino o agentes espesantes o de suspensión. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la descripción incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensoactivos. En una modalidad, el oligómero antisentido o el conjugado de oligómero antisentido de la composición farmacéutica está de acuerdo con la Fórmula (III) o la Fórmula (VII), respectivamente.

Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos sobre los conjugados de oligómero de la presente puede asegurarse mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido sórbico de fenol, y similares. También puede ser conveniente incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es conveniente disminuir la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca

solubilidad en agua, entre otros métodos conocidos en la técnica. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra al disolver o suspender el fármaco en un vehículo aceitoso.

Las formas de depósito inyectable pueden elaborarse mediante la formación de matrices microencapsuladas de los conjugados de oligómero de la presente en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la relación del oligómero con respecto al polímero, y la naturaleza del polímero particular empleado, y la naturaleza del polímero particular empleado, la velocidad de liberación del oligómero puede ser controlada. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también pueden prepararse atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones compatibles con los tejidos corporales.

Cuando los conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción se administran como productos farmacéuticos, a seres humanos y animales, estos pueden proporcionarse *per se* o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0.1 a 99 % (más preferentemente, de 10 a 30 %) del conjugado de oligómero antisentido en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones o preparaciones de la presente descripción pueden proporcionarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Típicamente, se proporcionan en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de cápsula o comprimido, mediante inyección, inhalación, loción ocular, ungüento, supositorio, o infusión; por vía tópica mediante loción o ungüento; o rectal mediante supositorios.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada,

y/o las composiciones farmacéuticas de la presente descripción, pueden formularse en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta descripción pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que sea inaceptablemente tóxica para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del conjugado de oligómero antisentido particular de la presente descripción empleado, o el éster, sal o amida de este, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción o el metabolismo del oligómero particular que se emplea, la velocidad y el grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el oligómero particular empleado, la edad, sexo, peso, afección, salud general e historia clínica previa del paciente que se trata, y factores similares conocidos en la técnica médica.

Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar y recetar fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los conjugados de oligómero antisentido de la descripción empleados en la composición farmacéutica en niveles inferiores que los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un conjugado de oligómero antisentido de la descripción será esa cantidad del conjugado de oligómero antisentido que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Tal dosis eficaz, en general, dependerá de los factores descritos en la presente. Generalmente, las dosis intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los conjugados de oligómero antisentido de esta

descripción para un paciente, cuando se usan para los efectos indicados, variarán de alrededor de 0.0001 a alrededor de 100 mg por kilogramo de peso corporal por día.

En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido de la presente descripción se administran en dosis, generalmente, de alrededor de 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunos casos, pueden ser necesarias dosis mayores de 160 mg/kg. En algunas modalidades, las dosis para administración i.v. son de alrededor de 0.5 mg a 160 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran en dosis de alrededor de 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 modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran en dosis de alrededor de 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, incluidos todos los números enteros entre estos. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 10 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 20 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 30 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 40 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 60 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 80 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 160 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero se administra a 50 mg/kg.

En algunas modalidades, los oligómeros antisentido de la presente descripción se administran en dosis, generalmente, de alrededor de 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunos casos,

pueden ser necesarias dosis mayores de 160 mg/kg. En algunas modalidades, las dosis para administración i.v. son de alrededor de 0.5 mg a 160 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran en dosis de alrededor de 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 modalidades, los oligómeros antisentido se administran en dosis de alrededor de 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, incluidos todos los números enteros entre estos. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 10 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 20 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 30 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 40 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 60 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 80 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 160 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido se administra a 50 mg/kg.

En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra en dosis, generalmente, de alrededor de 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunas modalidades, las dosis del conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) para administración i.v. son de alrededor de 0.5 mg a 160 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra en dosis de alrededor de

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 modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra en dosis de alrededor de 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, incluidos todos los números enteros entre estos. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 10 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 20 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 30 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 40 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 60 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 80 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 160 mg/kg. En algunas modalidades, el conjugado de oligómero antisentido de la Fórmula (III) se administra a 50 mg/kg.

En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra en dosis, generalmente, de alrededor de 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunas modalidades, las dosis del oligómero antisentido de la Fórmula (IV) para administración i.v. son de alrededor de 0.5 mg a 160 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra en dosis de alrededor de 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 modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra en dosis de alrededor de 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, incluidos todos los números enteros entre estos. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 10 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 20 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 30 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 40 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 60 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 80 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 160 mg/kg. En algunas modalidades, el oligómero antisentido de la Fórmula (IV) se administra a 50 mg/kg.

Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más subdosis administradas por separado en intervalos apropiados a durante el día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. En ciertas situaciones, la dosificación es una administración por día. En ciertas modalidades, 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 sea necesario, para mantener la expresión deseada de una proteína distrofina funcional. En ciertas modalidades, la

dosificación es una o más administraciones una vez cada dos semanas. En algunas modalidades, la dosificación es una administración una vez cada dos semanas. En varias modalidades, la dosificación es una o más administraciones cada mes. En ciertas modalidades, la dosificación es una administración cada mes.

En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 10 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 20 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 30 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “semanalmente” tiene el significado aceptado en la técnica de “cada semana”.

En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 10 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 20 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 30 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran semanalmente a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “semanalmente” tiene el significado aceptado en la técnica de “cada semana”.

En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 10 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 20 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 30 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran bisemanalmente a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “bisemanalmente” tiene el significado aceptado en la técnica de “cada dos semanas”.

En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 10 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 20 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 30 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran bisemanalmente a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “bisemanalmente” tiene el significado aceptado en la técnica de “cada dos semanas”.

En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 10 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 20 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de

oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 30 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “cada tres semanas” tiene el significado aceptado en la técnica de “a la tercera semana”.

En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 10 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 20 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 30 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran cada tres semanas a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “cada tres semanas” tiene el significado aceptado en la técnica de “a la tercera semana”.

En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 10 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 20 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 30 mg/kg. En varias modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados

de oligómero antisentido se administran mensualmente a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “mensualmente” tiene el significado aceptado en la técnica de “cada mes”.

En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 10 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 20 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 30 mg/kg. En varias modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 40 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 60 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 80 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 100 mg/kg. En algunas modalidades, los oligómeros antisentido se administran mensualmente a 160 mg/kg. Tal como se usa en la presente, se entiende que “mensualmente” tiene el significado aceptado en la técnica de “cada mes”.

Como podría entenderse en la técnica, las administraciones semanales, cada dos semanas, cada tres semanas o mensuales pueden ser en una o más administraciones o subdosis, tal como se describe en la presente.

Las moléculas de ácido nucleico, oligómeros antisentido, y conjugados de oligómero antisentido descritos en la presente pueden administrarse a las células mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, de modo no restrictivo, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, tal como se describe en la presente y se conoce en la técnica. En ciertas modalidades, puede utilizarse

tecnología de microemulsión para mejorar la biodisponibilidad de los agentes farmacéuticos lipofílicos (insolubles en agua). Los ejemplos incluyen Trimetrina (Dordunoo, S. K., et ál., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991) y REV 5901 (Sheen, P. C., et ál., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Entre otros beneficios, la microemulsión proporciona biodisponibilidad mejorada al dirigir, preferentemente, la absorción al sistema linfático en lugar del sistema circulatorio, con lo cual se evita el hígado, y se previene la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.

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

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

Los ejemplos de portadores anfifílicos incluyen glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolizados saturados y monoinsaturados, tales como aquellos obtenidos a partir de varios aceites vegetales completamente o parcialmente hidrogenados. Tales aceites pueden consistir

ventajosamente en monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos y ésteres de mono-poli(etilenglicol) y di-poli(etilenglicol) de los ácidos grasos correspondientes, con una composición de ácidos grasos particularmente preferida que incluye ácido cáprico al 4-10 %, ácido cáprico al 3-9 %, ácido láurico al 40-50 %, ácido mirístico al 14-24 %, ácido palmítico al 4-14 %, y ácido esteárico al 5-15 %. Otra clase útil de portadores anfifílicos incluye sorbitán y/o sorbitol parcialmente esterificados, con ácidos grasos saturados o monoinsaturados (serie SPAN) o análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).

Los portadores anfifílicos comercialmente disponibles pueden ser particularmente útiles, e incluyen serie Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglicol (todos fabricados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), PEG-mono-oleato, PEG-di-oleato, PEG-mono-lauratoe y di-laurato, Lecitina, Polisorbato 80, etc. (producidos y distribuidos por diversas empresas en los Estados Unidos y en todo el mundo).

En ciertas modalidades, el suministro puede realizarse mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas, y similares, para la introducción de las composiciones farmacéuticas de la presente descripción en células hospedadoras adecuadas. En particular, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden formularse para su suministro encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula, o similares. La formulación y el uso de tales vehículos de suministro pueden realizarse mediante el uso de técnicas convencionales y conocidas.

Los polímeros hidrofílicos adecuados para su uso en la presente descripción son aquellos que son fácilmente solubles en agua, pueden unirse covalentemente a un lípido que forma una vesícula, y que se toleran *in vivo* sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poliláctico (también denominado poliláctido), ácido poliglicólico (también denominado poliglicólido), un copolímero de ácido

poliláctico-poliglicólico, y alcohol polivinílico. En ciertas modalidades, los polímeros tienen un peso molecular promedio en peso de alrededor de 100 o 120 dalton hasta alrededor de 5000 o 10 000 dalton, o de alrededor de 300 dalton a alrededor de 5000 dalton. En otras modalidades, el polímero es poli(etilenglicol) y tiene un peso molecular promedio en peso de alrededor de 100 a alrededor de 5000 dalton, o tiene un peso molecular promedio en peso de alrededor de 300 a alrededor de 5000 dalton. En ciertas modalidades, el polímero es a poli(etilenglicol) y tiene un peso molecular promedio en peso de alrededor de 750 dalton, por ejemplo, PEG(750). Los polímeros también pueden definirse por el número de monómeros en estos; una modalidad preferida de la presente descripción utiliza polímeros con al menos alrededor de tres monómeros, dichos polímeros de PEG que consisten en tres monómeros tienen un peso molecular de aproximadamente 132 dalton.

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

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

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que consisten en 6, 7 u 8 unidades de glucosa, indicadas con la letra griega α, β o γ, respectivamente. Las unidades de glucosa están

enlazadas por enlaces α-1,4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación de silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) están ubicados en un lado del anillo, mientras todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 están situados en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrofílicas, lo que hace que las ciclodextrinas sean solubles en agua. Por el contrario, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrofóbicas, puesto que están alineadas por el hidrógeno de los átomos de C-3 y C-5, y por oxígenos como éter. Estas matrices permiten la formación de complejos con una variedad de compuestos relativamente hidrofóbicos que incluyen, por ejemplo, compuestos esteroides tales como 17α-estradiol (véase, por ejemplo, van Uden et ál. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). La formación de complejos se produce mediante interacciones Van der Waals y mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de las ciclodextrinas, véase, Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994).

Las propiedades físicoquímicas de los derivados de ciclodextrina dependen en gran medida del tipo y el grado de sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua varía de insoluble (por ejemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) a 147 % soluble (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos solventes orgánicos. Las propiedades de las ciclodextrinas permiten el control de la solubilidad de varios componentes de formulación al aumentar o disminuir su solubilidad.

Se han descrito múltiples ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), et ál. (patente de EE. UU. n.º 3,453,259) y Gramera, et ál. (patente de EE. UU. n.º 3,459,731) describen ciclodextrinas electroneutras. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), patente de EE. UU. n.º 3,453,257], ciclodextrinas reticuladas insolubles (Solms, patente de EE. UU. n.º 3,420,788), y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), patente de EE. UU. n.º 3,426,011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, se han agregado ácidos carboxílicos, ácidos

fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfónicos, ácidos tiosulfínicos, y ácidos sulfónicos a la ciclodextrina precursora [véase, Parmeter (III), supra]. Además, los derivados de ciclodextrina de sulfoalquiléter han sido descritos por Stella, et ál. (patente de EE. UU. n.º 5,134,127).

Los liposomas consisten en al menos una membrana de bicapa lipídica que encierra un compartimiento interno acuoso. Los liposomas pueden caracterizarse por el tipo de membrana y por tamaño. Las vesículas unilaminares pequeñas (SUV) tienen una membrana única y su diámetro típicamente varía entre 0.02 y 0.05 μm; las vesículas unilaminares grandes (LUV) son típicamente más grandes que 0.05 μm. Las vesículas grandes oligolaminares y vesículas multilaminares tienen múltiples capas de membrana usualmente concéntricas, y son típicamente más grandes que 0.1 μm. Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas más pequeñas contenidas dentro de una vesícula más grande, se denominan vesículas multivesiculares.

Un aspecto de la presente descripción se refiere a formulaciones que comprenden liposomas que contienen un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción, donde la membrana del liposoma se formula para proporcionar un liposoma con capacidad portadora aumentada. De manera alternativa o adicional, el oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción puede estar contenido, o adsorberse, dentro de la bicapa del liposoma. Un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción puede agregarse a un tensoactivo lipídico y transportarse dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma se formul para resistir los efectos disruptivos del agregado de agente activo-tensoactivo.

De acuerdo con una modalidad de la presente descripción, la bicapa lipídica de un liposoma contiene lípidos derivados con poli(etilenglicol) (PEG), de manera que las cadenas de PEG se

extienden desde la superficie interna de la bicapa lipídica en el espacio interior encapsulado por el liposoma, y se extienden desde el exterior de la bicapa lipídica en el ambiente circundante.

Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente descripción están en forma solubilizada. Los agregados de tensoactivo y agente activo (tales como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) pueden estar atrapados dentro del espacio interior de los liposomas de acuerdo con la presente descripción. Un tensoactivo actúa para dispersar y solubilizar el agente activo, y puede seleccionarse de cualquier tensoactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, que incluyen, de modo no taxativo, lisofosfatidilcolinas biocompatibles (LPG) con longitudes de cadena variables (por ejemplo, de alrededor de C14 a alrededor de C20). Los lípidos derivados de polímeros, tales como lípidos PEG, también pueden ser utilizados para la formación de micelas ya que actuarán para inhibir la fusión de la membrana/micela, y ya que la adición de un polímero a moléculas tensoactivas disminuye la CMC del tensoactivo y ayuda en la formación de micelas. Se prefieren los tensoactivos con CMO en el intervalo micromolar; los tensoactivos con CMC superiores pueden ser utilizados para preparar micelas atrapadas dentro de liposomas de la presente descripción.

Los liposomas de acuerdo con la presente descripción pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4,235,871; la solicitud de 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, los liposomas de la presente descripción pueden prepararse mediante difusión de un lípido derivado con un polímero hidrofílico en liposomas formados previamente, tal como mediante la exposición de los liposomas formados previamente a micelas compuestas por polímeros injertados en lípidos, en concentraciones de lípido que corresponden al porcentaje molar final del lípido derivado que se desea en el liposoma. Los liposomas que contienen un polímero hidrofílico también pueden

formase mediante técnicas de homogeneización, hidratación del campo lipídico o extrusión, tal como se conoce en la técnica.

En otro procedimiento ilustrativo de formulación, el agente activo se dispersa primero mediante sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro tensoactivo con CMC baja (que incluye lípidos injertados en polímeros) que solubiliza fácilmente las moléculas hidrofóbicas. La suspensión micelar resultante del agente activo se usa luego para rehidratar una muestra lipídica seca que contiene un porcentaje molar adecuado de lípidos injertados en polímeros, o colesterol. La suspensión de lípido y de agente activo se forma luego en los liposomas mediante el uso de técnicas de extrusión como se conoce en la técnica, y los liposomas resultantes se separan de la solución no encapsulada mediante separación de columna estándar.

En un aspecto de la presente descripción, los liposomas se preparan para tener tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaño seleccionado. Un método de selección de tamaño eficaz involucra la extrusión de 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 más o menos con los tamaños más grandes de los liposomas producidos por extrusión a través de dicha membrana. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4,737,323 (12 de abril de 1988). En ciertas modalidades, pueden utilizarse reactivos tales como DharmaFECT® y Lipofectamine® para introducir polinucleótidos o proteínas en células.

Las características de liberación de una formulación de la presente descripción dependen del material encapsulante, la concentración del fármaco encapsulado, y la presencia de modificadores de liberación. Por ejemplo, la liberación puede manipularse para que dependa del pH, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento sensible al pH que se libera solamente a un pH bajo, como en el estómago, o a un pH superior, como en el intestino. Puede usarse un recubrimiento entérico para impedir que se produzca la liberación hasta después del pasaje 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 la inclusión de agentes que forman poros o sales, que pueden aumentar la absorción de agua o la liberación de fármaco mediante difusión de la cápsula. También pueden usarse excipientes que modifican la solubilidad del fármaco para controlar la velocidad de liberación. También pueden incorporarse agentes que mejoran la degradación de la matriz o la liberación de la matriz. Estos pueden agregarse al fármaco, agregarse como una fase separada (es decir, como partículas), o pueden codisolverse en la fase polimérica dependiendo del compuesto. En la mayoría de los casos la cantidad debe ser de entre 0.1 y 30 por ciento (p/p de polímero). Los tipos de potenciadores de degradación incluyen sales inorgánicas tales como sulfato de amonio y cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido benzoico, y ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de zinc e hidróxido de zinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina, y tensoactivos tales como Tween® y Pluronic®. Los agentes que forman poros, que agregan microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua tales como sales inorgánicas y azúcares), se agregan como partículas. El intervalo es típicamente de entre uno y treinta por ciento (p/p de polímero).

La absorción también puede manipularse mediante la alteración del tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante el recubrimiento de la partícula con un polímero que se adhiere a la mucosa, o mediante su selección como el material encapsulante. Los ejemplos incluyen la mayoría de polímeros con grupos carboxilo libres, tales como quitosano, celulosas, y, especialmente, poliacrilatos (tal como se usa en la presente, “poliacrilatos” se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados

tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

Un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido puede formularse para estar contenido dentro de un dispositivo o implante médico o quirúrgico, o adaptarse para su liberación mediante este. En ciertos aspectos, un implante puede recubrirse o tratarse de otro modo 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 descripción (es decir, la composición puede adaptarse para su uso con un dispositivo médico mediante el uso de un hidrogel u otro polímero). Los polímeros y copolímeros para recubrir dispositivos médicos con un agente son conocidos en la técnica. Los ejemplos de implantes incluyen, de modo no taxativo, stent, stent que libera fármaco, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéteres de diálisis, injertos vasculares, válvulas cardíacas prostésicas, marcapasos cardíacos, desfibriladores cardioversores implantables, agujas IV, dispositivos para formación y colocación ósea, tales como pernos, tornillos, placas, y otros dispositivos, y matrices de tejido artificial para cicatrización de heridas.

Además de los métodos proporcionados en la presente, los oligómeros antisentido o conjugados de oligómero antisentido para su uso de acuerdo con la descripción pueden formularse para administración en cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros productos farmacéuticos. Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido y sus formulaciones correspondientes pueden administrarse solos o en combinación con otras estrategias terapéuticas en el tratamiento de la distrofia muscular, tal como trasplante de mioblastos, terapias de células madre, administración de antibióticos aminoglucósidos, inhibidores de proteasoma, y terapias de regulación por aumento (por ejemplo, regulación por aumento de utrofina, un parálogo autosómico de distrofina).

En algunas modalidades, el agente terapéutico adicional puede administrarse antes, concurrentemente, o posteriormente con respecto a la administración del conjugado de oligómero antisentido de la presente descripción. Por ejemplo, los conjugados de oligómero antisentido pueden administrarse en combinación con un esteroide y/o antibiótico. En ciertas modalidades, los conjugados de oligómero antisentido se administran a un paciente que se encuentra en terapia de base con esteroides (por ejemplo, terapia de base con esteroides continua/crónica o intermitente). Por ejemplo, en algunas modalidades el paciente ha sido tratado con un corticoesteroide antes de la administración de un oligómero antisentido y continúa recibiendo la terapia con esteroides. En algunas modalidades, el esteroide es glucocorticoide o prednisona.

Se pretende que las vías de administración sean solamente una guía puesto que un médico experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración óptima y cualquier dosificación para cualquier animal y afección particular. Se han intentado múltiples procedimientos para introducir nuevo material genético funcional en las células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). Estos procedimientos incluyen la integración del gen para que se exprese en retrovirus modificados (Friedmann (1989) supra; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), supl.: 5074S-5079S); integración en vectores no retrovirus (por ejemplo, vectores virales adenoasociados) (Rosenfeld, et ál. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et ál. (1991) Science, 252:431-434); o suministro de un transgén enlazado a un elemento potenciador-promotor heterólogo mediante liposomas (Friedmann (1989), supra; Brigham, et ál. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; Nabel, et ál. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, et ál. (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 a base de cationes específicos del ligando (Wu y Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) o el uso de vectores de expresión de ADN no conjugado (Nabel et ál. (1990), supra; Wolff et ál. (1990)

Science, 247:1465-1468). La inyección directa de transgenes en el tejido produce solamente expresión localizada (Rosenfeld (1992) supra; Rosenfeld et ál. (1991) supra; Brigham et ál. (1989) supra; Nabel (1990) supra; y Hazinski et ál. (1991) supra). El grupo Brigham et ál. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 y Clinical Research (1991) 39 (resumen)) han informado la transfección *in vivo* solamente de pulmones de ratón después de la administración intravenosa o intratecal de un complejo de liposoma de ADN. Un ejemplo de un artículo revisado de procedimientos de terapia génica en humanos es: Anderson, Science (1992) 256:808-813.

En una modalidad adicional, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden comprender adicionalmente un carbohidrato como se proporciona en Han et ál., Nat. Comms. 7, 10981 (2016), que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden comprender 5 % de un carbohidrato de hexosa. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la descripción puede comprender 5 % de glucosa, 5 % de fructuosa, o 5 % de manosa. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden comprender 2.5 % de glucosa y 2.5 % de fructuosa. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden comprender un carbohidrato seleccionado de: arabinosa presente en una cantidad de 5 % en volumen, glucosa presente en una cantidad de 5 % en volumen, sorbitol presente en una cantidad de 5 % en volumen, galactosa presente en una cantidad de 5 % en volumen, fructuosa presente en una cantidad de 5 % en volumen, xilitol presente en una cantidad de 5 % en volumen, manosa presente en una cantidad de 5 % en volumen, una combinación de glucosa y fructuosa cada una presente en una cantidad de 2.5 % en volumen, y una combinación de glucosa presente en una cantidad de 5.7 % en volumen, fructuosa presente en una cantidad de 2.86 % en volumen, y xilitol presente en una cantidad de 1.4 % en volumen.

IV. Métodos de Uso

Restauración del marco de lectura de distrofina mediante el uso de salto de exón

Se sugiere un procedimiento terapéutico potencial para el tratamiento de la DMD, causada por las mutaciones fuera del marco en el gen de distrofina, mediante la forma más leve de distrofinopatía conocida como BMD, que es causada por mutaciones dentro del marco. La capacidad para convertir una mutación fuera del marco en una mutación dentro del marco podría conservar hipotéticamente el marco de lectura de ARNm y producir una proteína distrofina internamente acortada pero funcional. Los oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción se diseñaron para lograrlo.

La hibridación de PMO con la secuencia de pre-ARNm objetivo interfiere con la formación del complejo de empalme de pre-ARNm y elimina el exón 52 del ARNm maduro. La estructura y conformación de oligómeros antisentido y conjugados de oligómero antisentido de la descripción permite el emparejamiento de bases específico de la secuencia con la secuencia complementaria. Mediante un mecanismo similar, eteplirsen, por ejemplo, que es un PMO que se diseñó para saltar el exón 51 del pre-ARNm de distrofina permite el emparejamiento de bases específico de la secuencia con la secuencia complementaria contenida en el exón 51 del pre-ARNm de distrofina.

El ARNm de distrofina normal que contiene todos los 79 exones producirá la proteína distrofina normal. La gráfica en la Figura 1 representa una sección pequeña del pre-ARNm de distrofina y ARNm maduro, del exón 47 al exón 52. La forma de cada exón representa cómo se dividen los codones entre los exones; debe observarse que un codón consiste en tres nucleótidos. Los exones de forma rectangular comienzan y terminan con codones completos. Los exones en forma de flecha comienzan con un codón completo, pero terminan con un codón dividido, que contiene solamente el nucleótido #1 del codón. Los nucleótidos #2 y #3 de este codón están contenidos en el exón posterior que comenzará con una forma de espiga.

El ARNm de distrofina que carece de exones completos del gen de distrofina típicamente da como resultado DMD. La gráfica en la Figura 2 ilustra un tipo de mutación genética (eliminación del exón 50) que se conoce que da como resultado DMD. Puesto 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 cambia, lo que da como resultado un marco de lectura de ARNm fuera del marco y la incorporación de aminoácidos incorrectos corriente abajo de la mutación. La ausencia posterior de un dominio de unión a distroglicano C-terminal funcional da como resultado la producción de una proteína distrofina instable.

Eteplirsen salta el exón 51 para restaurar el marco de lectura de ARNm. Puesto 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, lo que da como resultado la producción de una proteína distrofina internamente acortada con un sitio de unión a distroglicano intacto similar a una mutación de BMD “dentro del marco” (Figura 3).

La viabilidad de la mejora del fenotipo de DMD mediante el uso de salto de exón para restaurar el marco de lectura abierto de ARNm de distrofina está respaldada por la investigación no clínica. Diversos estudios en modelos de animales distróficos de DMD han demostrado que la restauración de distrofina mediante salto de exón produce mejoras confiables en la resistencia y función muscular (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 se presenta en un estudio en el que se compararon los niveles de distrofina después de la terapia de salto de exón (mediante el uso de un PMO) con la función muscular en el mismo tejido. En ratones mdx distróficos, los músculos tibiales anteriores (TA) tratados con un PMO específico de ratón mantuvieron ~75 % de su capacidad de fuerza máxima después de las contracciones que inducen estrés, mientras que los músculos TA contralaterales no tratados mantuvieron solamente ~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 salto de exón mediante el uso de un PMO específico para su mutación genética una vez a la semana durante 5 a 7 semanas, o cada dos semanas durante 22 semanas. Después de la terapia de salto de exón, los 3 perros demostraron expresión corporal amplia extensiva de distrofina en el músculo esquelético, así como también mantuvieron o mejoraron la ambulación (prueba de corrida de 15 m) con respecto al valor inicial. Por el contrario, los perros *CXMD* de la misma edad no tratados mostraron una disminución marcada en la ambulación durante el curso del estudio (Yokota 2009).

Se demostró que los PMO tienen más actividad de salto de exón en concentraciones equimolares que los fosforotioatos en ratones mdx y en el modelo de ratón de DMD humanizada (hDMD), que expresa la transcripción de DMD humana completa (Heemskirk 2009). Experimentos *in vitro* que usan reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y transferencia Western (WB) en células del músculo esquelético humano normales o en células musculares de pacientes con DMD con diferentes mutaciones susceptibles al salto del exón 51 identificaron el eteplirsen (un PMO) como un inductor potente del salto del exón 51. El salto del exón 51 inducido por eteplirsen ha sido confirmado *in vivo* en el modelo de ratón de hDMD (Arechavala-Gomeza 2007).

Los resultados clínicos para analizar el efecto de un oligómero antisentido o un conjugado de oligómero antisentido, que es complementario a una región objetivo del exón 52 del pre-ARNm de distrofina humana e induce el salto del exón 52, incluyen el porcentaje de fibras de distrofina positivas (PDPF), la prueba de caminata de seis minutos (6MWT), pérdida de ambulación (LOA), Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA), pruebas de función pulmonar (PFT), capacidad para levantarse (desde una posición supina) sin apoyo externo, producción de distrofina *de novo*, y otras medidas funcionales.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para producir distrofina

en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido, o sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido, o sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente. En ciertas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para restaurar un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de la proteína distrofina en un sujeto con distrofia muscular de Duchenne (DMD), que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52. La producción de proteína puede medirse mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), análisis de transferencia western, o inmunohistoquímica (IHC).

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para tratar la DMD en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido, o sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente. En algunas modalidades, la presente descripción proporciona métodos para tratar la DMD en un sujeto que lo necesita, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido, o sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente. En varias modalidades, el tratamiento del sujeto se mide mediante el retraso de la evolución de la enfermedad. En algunas modalidades, el tratamiento del sujeto se mide mediante el mantenimiento de la ambulación en el sujeto o la reducción de la pérdida de la ambulación en el sujeto. En algunas modalidades, la ambulación se mide mediante el uso de la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT). En ciertas modalidades, la ambulación se mide mediante el uso

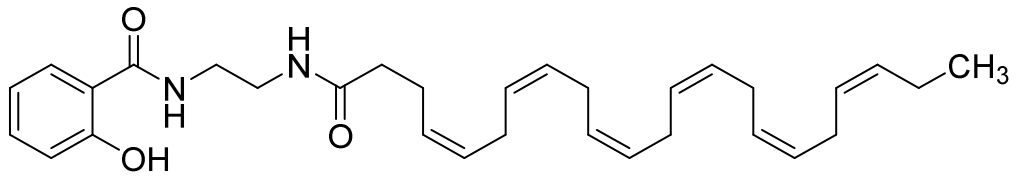
de la Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA).

En varias modalidades, la presente descripción proporciona métodos para mantener la función pulmonar o reducir la pérdida de la función pulmonar en un sujeto con DMD, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de DMD que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un conjugado de oligómero antisentido, o sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente. En varias modalidades, la presente descripción proporciona métodos para mantener la función pulmonar o reducir la pérdida de la función pulmonar en un sujeto con DMD, en donde el sujeto tiene una mutación del gen de DMD que es susceptible al salto del exón 52, el método comprende administrar al sujeto un oligómero antisentido, o sal farmacéuticamente aceptable de este, como se describe en la presente. En algunas modalidades, la función pulmonar se mide como presión espiratoria máxima (MEP). En ciertas modalidades, la función pulmonar se mide como presión inspiratoria máxima (MIP). En algunas modalidades, la función pulmonar se mide como capacidad vital forzada (FVC).

En una modalidad adicional, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden coadministrarse con un carbohidrato en los métodos de la descripción, ya sea en la misma formulación o en una formulación separada, como se proporciona en Han et ál., Nat. Comms. 7, 10981 (2016), que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia. En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden coadministrarse con 5 % de un carbohidrato de hexosa. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden coadministrarse con 5 % de glucosa, 5 % de fructuosa, o 5 % de manosa. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas de la descripción pueden coadministrarse con 2.5 % de glucosa y 2.5 % de fructuosa. En algunas modalidades, la composición farmacéutica de la descripción puede coadministrarse con un carbohidrato seleccionado de: arabinosa presente en una cantidad de 5 % en volumen, glucosa presente en

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

En varias modalidades, un oligómero antisentido o conjugado de oligómero antisentido de la descripción se coadministra con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antiinflamatorio no esteroide. En algunas modalidades, el compuesto antiinflamatorio no esteroide es un inhibidor de NF-kB. Por ejemplo, en algunas modalidades, el inhibidor de NF-kB puede ser CAT-1004 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En varias modalidades, el inhibidor de NF-kB puede ser un conjugado de salicilato y DHA. En algunas modalidades, el inhibidor de NF-kB es CAT-1041 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En ciertas modalidades, el inhibidor de NF-kB es un conjugado de salicilato y EPA. En varias modalidades, el inhibidor de NF-kB es



, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas modalidades, el compuesto antiinflamatorio no esteroide es un inhibidor de TGF-b. Por ejemplo, en ciertas modalidades, el inhibidor de TGF-b es HT-100.

En ciertas modalidades, se describe un oligómero antisentido y conjugado de oligómero antisentido, tal como se describe en la presente, para su uso en terapia. En ciertas modalidades, se describe un oligómero antisentido y conjugado de oligómero antisentido, tal

como se describe en la presente para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. En ciertas modalidades, se describe un oligómero antisentido y conjugado de oligómero antisentido, tal como se describe en la presente, para su uso en la fabricación de un medicamento para uso en terapia. En ciertas modalidades, se describe un oligómero antisentido y conjugado de oligómero antisentido, tal como se describe en la presente, para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

V. Kits

La descripción también proporciona kits para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética, dicho kit comprende al menos una molécula antisentido (por ejemplo, un oligómero antisentido que comprende la secuencia base indicada en la SEQ ID NO: 1 o un conjugado de oligómero antisentido que comprende el oligómero antisentido que comprende la secuencia base indicada en la SEQ ID NO: 1), envasado en un recipiente adecuado, junto con instrucciones para su uso. Los kits también pueden contener reactivos periféricos tales como amortiguadores, estabilizadores, etc. Los expertos en el campo de la técnica apreciarán 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 modalidad, el kit comprende un conjugado de oligómero antisentido de acuerdo con la Fórmula (III) o un oligómero antisentido de acuerdo con la Fórmula (IV).

Ejemplos

Aunque la descripción anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ejemplo e ilustración con fines de claridad para la mejor comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica en vista de las instrucciones de esta descripción, que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los

siguientes ejemplos se proporcionan únicamente de forma ilustrativa y no taxativa. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para proporcionar resultados esencialmente similares.

Materiales y Métodos

Condiciones de tratamiento de cultivo de tejidos y células

Se utilizaron monocitos humanos diferenciados (ZenBio, Inc.) para medir el salto de exón. Específicamente, se cultivaron mioblastos (ZenBio, Inc., SKB-F) hasta 80-90 % de confluencia a 37 °C y 5 % de CO_2 en medio de crecimiento (SKB-M; ZenBio, Inc.). La diferenciación se inició mediante el reemplazo del medio de crecimiento con el medio de diferenciación (SKM-D; ZenBio, Inc.). Para evaluar el salto del exón 52, $1x10^4$ células diferenciadas se colocaron en una placa de 24 pocillos y se agregó 1 mL de medio de diferenciación (SKM-D; ZenBio, Inc.) que contenía varias concentraciones de PMO o PPMO a cada cavidad y se incubó durante 96 horas.

Análisis de transferencia western

Para el análisis de transferencia western, el tejido se homogeneizó con amortiguador de homogenización (SDS al 4 %, urea 4 M, tris-HCl 125 mM (pH 6.8)) en una relación de 9 a 18 x 20-µm de secciones de tejido a aproximadamente 5 mm de diámetro en 133 µL de amortiguador. El lisado correspondiente se recolectó y se sometió a cuantificación de proteína mediante el uso del kit de ensayo de proteína RC DC según las instrucciones del fabricante (BioRad Cat. 500-0122). Las muestras de extracto de tejido se diluyeron 1:10 mediante el uso de amortiguador de homogenización para estar dentro del intervalo de la curva estándar de BSA. Las muestras se prepararon de manera que 35 µl de muestra pudieran contener la cantidad deseada de proteína mediante el uso de 25 µl de lisado de proteína, 7 µl de amortiguador de muestra NuPAGE LDS (Life Technologies Cat. NP0008, Carlsbad, California,

EE. UU.), y 3 µl de agente reductor NuPAGE (10x) (Life Technologies Cat. NP0004). Después de calentar las muestras de proteína durante 5 minutos a 95 °C, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se cargó sobre un gel de tri-acetato de poliacrilamina al 3-8 % mini, 1 mm, en 10 pocillos NuPAGE Novex (Life Technologies Cat. EA0375) a un máximo de 50 µg de carga de proteína total por carril. El gel se corrió a 150 voltios a temperatura ambiente hasta que el tinte frontal se deslizó del gel. Los geles de proteína resultantes se transfirieron a membranas de PVDF (Life Technologies Cat. LC2007) durante 75 minutos a temperatura ambiente con 30 voltios mediante el uso de amortiguador de transferencia NuPAGE (Life Technologies NP006-1), metanol al 10 % y antioxidante NuPAGE al 0.1 % (Life Technologies NP0005).

Después de la transferencia de proteína, las membranas de PVDF se sumergieron en amortiguador TTBS (1X TBS (Amresco Cat. J640-4L), tween-20 al 0.1 % (v/v)). Las membranas se transfirieron a leche seca sin grasa con amortiguador de bloqueo (5 % (p/v) (Lab Scientific Cat. M0841) en TTBS) y se pusieron en remojo durante la noche a 4 °C con balanceo suave. Después del bloqueo, las membranas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en DYS1 (Leica Cat. NCL-DYS1) diluidas a 1:20 mediante el uso de amortiguador de bloqueo, o 20 minutos a temperatura ambiente en anticuerpo anti-α-actinina (Sigma-Aldrich Cat. NA931V) diluidas a 1:100 000 con amortiguador de bloqueo, seguido por seis lavados (cinco minutos cada uno con TTBS). Se diluyó IgG anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare Cat. NA931V) a 1:40 000 mediante el uso de amortiguador de bloqueo y se agregó a las membranas durante 45 minutos (DYS1) o 15 minutos (α-actinina), seguido por seis lavados. Mediante el uso del kit de detección Western ECL Prime (GE Healthcare Cat. RPN2232), la película se expuso al gel y se desarrolló en consecuencia. La película desarrollada se barrió y analizó mediante el uso del software ImageQuant TL Plus (versión 8.1) y se realizó el análisis de regresión lineal mediante el uso del software Graphpad.

Cada gel de transferencia Western incluye una curva estándar de distrofina de 4 o 5 puntos

preparada mediante el uso de la proteína total extraída del tejido normal (cuádriceps de ratón, diafragma, o corazón), por ejemplo, diluida a 64 %, 16 %, 4 %, 1 %, y 0.25 % (véase, por ejemplo, las Figuras 5A y 5B) y se agregó a extracto de tejido con DMD (por ejemplo cuádriceps de ratón mdx, diafragma, o corazón, o cuádriceps de NHP, diafragma, o músculo liso (GI)). Las muestras de curva estándar se procesaron tal como se describió anteriormente. Se determinaron los niveles de proteína distrofina como porcentaje de los niveles de distrofina de tipo salvaje (%WT) mediante la comparación de las intensidades de banda de distrofina con la curva estándar del gel.

Análisis de RT-PCR

Para análisis de RT-PCR, se aisló ARN a partir de las células mediante el uso del kit de centrifugación Illustra GE de acuerdo con el protocolo del fabricante. El salto del exón 52 se midió mediante RT-PCR con un cebador directo que se une al exón 50, SEQ ID NO: 5 (5'-CTCTGAGTGGAAGGCGGTAA-3'), y un cebador inverso que se une al exón 53, SEQ ID NO: 6 (5'- ACCTGCTCAGCTTCTTCCTT-3'). El salto de exón 23 de ratón 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').

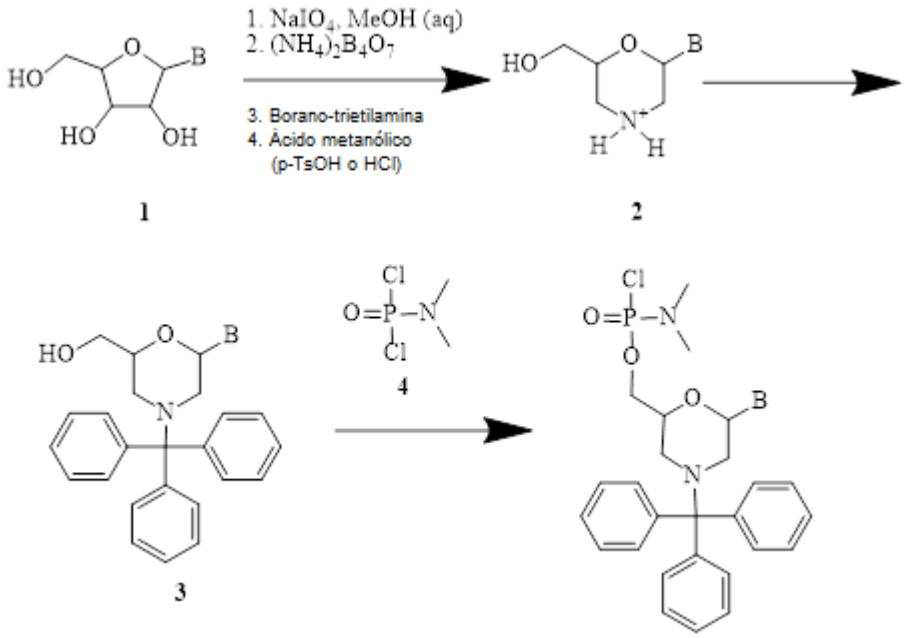
Después que el ARN se sometió a RT-PCR, las muestras se analizaron mediante el uso de una máquina Caliper, que usa electroforesis capilar en gel. El porcentaje de salto de exón se calculó mediante el uso de la siguiente ecuación: (área bajo la curva para bandas saltadas)/(suma del área bajo la curva para bandas saltadas y no saltadas)x100.

Inmunohistoquímica: tinción de distrofina

Se usaron secciones de tejido congelado de 10 micras de los cuádriceps de ratón para detectar la distrofina con el anticuerpo primario de distrofina (dilución 1:250, conejo, Abcam, cat#ab15277) en suero de cabra al 10 % + BSA al 1 % en PBS y anticuerpo secundario Alexa-Fluoro 488 anti-conejo de cabra

(dilución de 1:1000) en suero de cabra al 10 % + BSA al 1 %.

Preparación de subunidades de morfolino



Esquema 1: vía sintética general para obtener subunidades de PMO

Con referencia al Esquema de reacción 1, en donde B representa un resto de emparejamiento de bases, las subunidades de morfolino pueden prepararse a partir del ribonucleósido correspondiente (**1**) 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. El grupo protector en 3', generalmente, se elimina durante la síntesis de oligómero de estado sólido, tal como se describe con más detalle a continuación. El resto de emparejamiento de bases puede protegerse adecuadamente para la síntesis de oligómero de fase sólida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoilo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina, y pivaloiloximetilo para hipoxantina (I). El grupo pivaloiloximetilo puede ser introducido en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina. Aunque pueden emplearse una subunidad de hipoxantina no protegida, los rendimientos de activación son

bastante superiores cuando la base está protegida. Otros grupos protectores adecuados incluyen aquellos descritos en la Patente de EE. UU. n.º 8,076,476, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

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**.

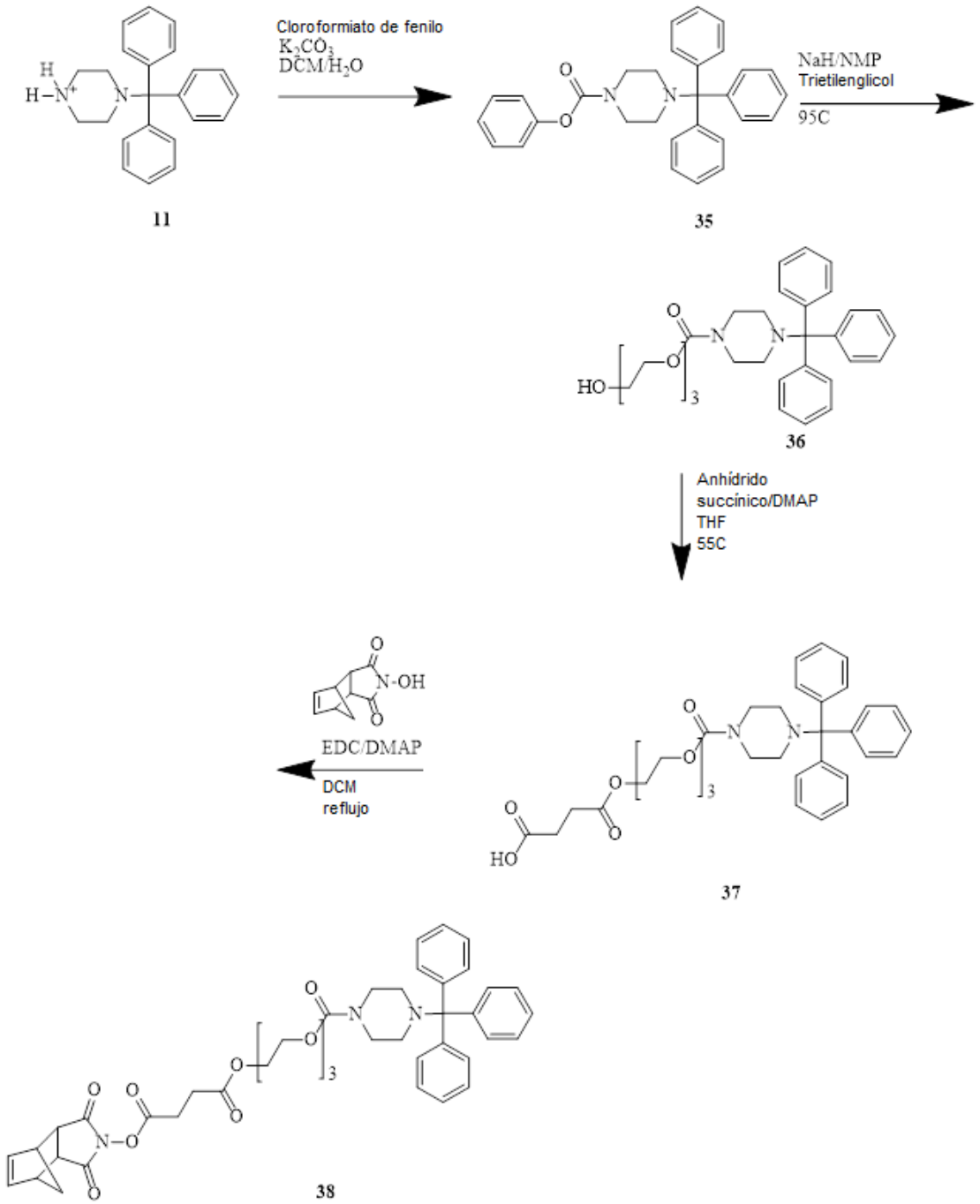
Los compuestos de la estructura **4** pueden prepararse mediante el uso de cualquier cantidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. El acoplamiento con el resto de morfolino procede luego tal como se explicó anteriormente.

Los compuestos de estructura **5** pueden usarse en la síntesis de oligómero de fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces entre subunidades. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica. Brevemente, un compuesto de la estructura **5** puede modificarse en el extremo 5' para que contenga un enlazador a un soporte sólido. Una vez unido al soporte, se elimina el grupo protector de **5** (por ejemplo, tritilo en el extremo 3') o y la amina libre se hace reaccionar 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 extremo 3' terminal puede eliminarse o dejarse si se desea una modificación en 3'. El oligo puede eliminarse del soporte sólido usando cualquiera de diversos métodos o tratamientos de ejemplo con una base para escindir el enlace con el soporte sólido.

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

Preparación de Oligómeros de Morfolino

La preparación de los compuestos de la descripción se realiza mediante el uso del siguiente protocolo de acuerdo con el Esquema 2:



Esquema 2: Preparación de ácido de cola activada

Preparación de fenilcarbamato de tritil piperazina **35**: A una solución enfriada del compuesto **11** en diclorometano (6 mL/g de **11**) se le agregó una solución de carbonato de potasio (3.2 eq) en

agua (4 mL/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se le agregó 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 hasta 20 °C. Después de la terminación de la reacción (1-2 h), las capas se separaron. La capa orgánica se lavó con agua, y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto **35** se aisló por cristalización de acetonitrilo.

Preparación de 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 agregó trietilenglicol (10.0 eq) y el compuesto **35** (1.0 eq). La suspensión resultante se calentó hasta 95 °C. Después de la terminación de la reacción (1-2 h), la mezcla se enfrió hasta 20 °C. A esta mezcla se le agregó diclorometano al 30 %/éter metil terc-butílico (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía el producto se lavó sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso, y cloruro de sodio acuoso saturado. El producto 36 se aisló por cristalización de diclorometano/éter metil terc-butílico/heptano.

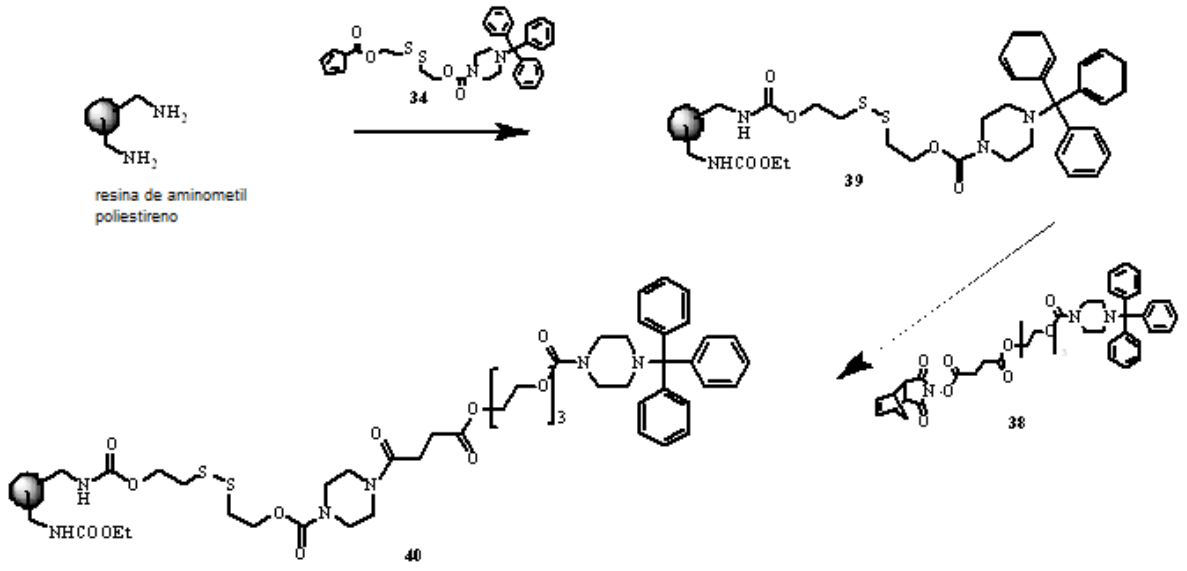
Preparación de ácido de cola **37**: A una solución del compuesto **36** en tetrahidrofurano (7 mL/g de **36**) se le agregó anhídrido succínico (2.0 eq) y DMAP (0.5 eq). La mezcla se calentó hasta 50 °C. Después de la terminación de la reacción (5 h), la mezcla se enfrió hasta 20 °C y se ajustó a pH 8.5 con $NaHCO_3$ acuoso. Se agregó éter metil terc-butílico, y el producto se extrajo en la capa acuosa. Se agregó diclorometano, y la mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contenía el producto se lavó con una mezcla de amortiguador de citrato a pH=3 y cloruro de sodio acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de **37** se usó sin aislamiento en la preparación del compuesto **38**.

Preparación de **38**: A la solución del compuesto **37** se agregó imida de 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 hasta 55 °C. Después de la terminación de la reacción (4-5 h), la mezcla se enfrió hasta

20 °C y se lavó sucesivamente con 1:1 de ácido cítrico 0.2 M/salmuera y salmuera. La solución de diclorometano se sometió a intercambio de solvente a acetona y después a N,N-dimetilformamida, y el producto se aisló por precipitación de acetona/N,N-dimetilformamida en cloruro de sodio acuoso saturado. El producto crudo se sometió a resuspensión varias veces en agua para retirar la N,N-dimetilformamida y sales residuales.

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

La introducción de la “Cola” activada sobre la resina cargada de anclaje se realizó en imidazolidinona de dimetilo (DMI) mediante el procedimiento usado para incorporación de las subunidades durante la síntesis de fase sólida.



Esquema 3: Preparación del soporte sólido para la síntesis de oligómeros de morfolino

Este procedimiento se realizó en un recipiente peptídico recubierto silanizado (ChemGlass, NJ, EE. UU.) con una frita de vidrio de porosidad gruesa (40-60 µm), agitador superior, y llave de paso de Teflón de 3 vías para permitir el burbujeo de N2 a través de la frita o una extracción de vacío.

Las etapas de lavado/tratamiento de resina en el siguiente procedimiento consisten en dos operaciones básicas: fluidización de resina o reactor de lecho agitado y extracción de

solvente/solución. Para la fluidización de la resina, la llave de paso se posiciona para permitir que el N2 fluya a través de la frita y el lavado/tratamiento de resina específico se agregó al reactor y se dejó que permeara y humedeciera completamente la resina. Luego, comenzó la mezcla y la suspensión de resina se mezcló durante el tiempo especificado. Para la extracción de solución/solvente, se detuvo la mezcla y el flujo de N2 y se encendió la bomba de vacío, y después la llave de paso se posiciono para permitir la evacuación del lavado/tratamiento de resina para desecharlo. Todos los volúmenes de lavado/tratamiento de resina fueron de 15 mL/g de resina, a menos que se indique de otro modo.

A la resina de aminometilpoliestireno (100-200 mesh; ~1.0 mmol/g de carga a base de sustitución de nitrógeno; 75 g, 1 eq, Polimer Labs, Reino Unido, parte #1464-X799) en un recipiente peptídico recubierto silanizado se le agregó 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y la resina se dejó hinchar con mezclado durante 1-2 h. Después de la evacuación del solvente hinchado, la resina se lavó 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). Después de la evacuación del lavado final, la resina se trató con una solución de anclaje de disulfuro **34** en 1-metil-2-pirrolidinona (0.17 M; 15 mL/g de resina, ~2.5 eq) y la mezcla de resina/reactivo se calentó a 45 °C durante 60 h. En la terminación de la reacción, el calentamiento de interrumpió y la solución de anclaje se evacuó y la resina se lavó con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trató con una solución de dicarbonato de dietilo al 10 % (v/v) 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 con una corriente de N2 durante 1-3 h y después al vacío a peso constante (± 2 %). Rendimiento: 110-150 % del peso de la resina original.

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

Un peso conocido de resina seca (25 ± 3 mg) se transfiere a un matraz volumétrico de 25 ml silanizado y se agregaron ~5 mL de ácido trifluoroacético al 2 % (v/v) en diclorometano. El contenido se mezcló mediante agitación suave y después se dejó reposar durante 30 min. El volumen se llevó hasta 25 mL con ácido trifluoroacético al 2 % (v/v) adicional en diclorometano y el contenido se mezcló completamente. Mediante el uso de una pipeta de desplazamiento positivo, se transfiere una alícuota de la solución que contiene tritilo (500 µl) se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y el volumen se llevó hasta 10 mL con ácido metanosulfónico.

El contenido de cationes de tritilo en la solución final se midió mediante absorbancia UV a 431.7 nm y se calculó la carga de resina en grupos tritilo por gramo de resina (µmol/g) mediante el uso de los volúmenes, diluciones, coeficiente de extinción (ε: 41 µmol-1cm-1) y peso de la resina apropiados. El ensayo se realizó por triplicado y se calculó la carga promedio.

El procedimiento de carga de resina en este ejemplo proporcionará la resina con una carga de aproximadamente 500 µmol/g. Se obtiene una carga de 300-400 en µmol/g si la etapa de incorporación de anclaje de disulfuro se realiza durante 24 h a temperatura ambiente.

Carga de cola: Mediante el uso de las mismas configuraciones y volúmenes que para la preparación de resina de disulfuro de aminometilpoliestireno, la Cola puede ser introducida en el soporte sólido. La resina cargada de anclaje se desprotegió primero en condición ácida 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, la resina **39** se lavó dos veces con diisopropiletilamina al 5 % en isopropanol al 25 %/diclorometano y una vez con DCM. A la resina se le agregó una solución de anhídrido benzoico (0.4 M) y NEM (0.4 M). Después de 25 min, la camisa del reactor se enfrió hasta temperatura ambiente, y la resina se lavó dos veces con 5% de diisopropiletilamina en isopropanol al 25 %/diclorometano y ocho veces con DCM. La resina **40** se filtró y se secó con alto vacío. La carga para la resina **40** se define por ser la carga

de la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno original **39** usada en la carga de la Cola.

Síntesis de Fase Sólida: Los oligómeros de morfolino se prepararon en un sintetizador peptídico automatizado Gilson AMS-422 en columnas de reacción de polipropileno Gilson de 2 mL (Parte # 3980270). Se colocó un bloque de aluminio con canales para flujo de agua alrededor de las columnas a medida que se asentaban en el sintetizador. El AMS-422 alternativamente agregará soluciones de lavado/reactivo, se detendrá durante un tiempo especificado, y evacuará las columnas mediante el uso de vacío.

Para los oligómeros en el intervalo de hasta alrededor de 25 subunidades de longitud, se prefiere la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno con carga cercana a 500 μmol/g de resina. Para los oligómeros más grandes, se prefiere la resina de disulfuro de aminometilpoliestireno con carga de 300-400 μmol/g de resina. Si se desea una molécula con cola-5', se elige la resina que ha sido cargada con la cola con las mismas pautas de carga.

Se prepararon las siguientes soluciones de reactivo:

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

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

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

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

En el sintetizador, con el bloque ajustado a 42 °C, a cada columna que contenía 30 mg de resina de disulfuro de aminometilpoliestireno (o resina de Cola) se le agregó 2 mL de 1-metil-2-pirrolidinona y se dejó asentar a temperatura ambiente durante 30 min. Después del lavado con 2 mL de diclorometano 2 veces, se empleó el siguiente ciclo de síntesis:

Etapa	Volumen	Suministro	Tiempo de espera
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

Las secuencias de los oligómeros individuales se programaron en el sintetizador de manera que cada columna reciba la solución de acoplamiento apropiada (A,C,G,T,I) en la secuencia

apropiada. Cuando el oligómero en una columna terminó la incorporación de su subunidad final, la columna se retiró del bloque y se realizó un ciclo final manualmente con una solución de acoplamiento compuesta por cloruro de 4-metoxitrifenilmetilo (0.32 M en DMI) que contenía 4-etilmorfolina 0.89 M.

Escisión de la resina y remoción de las bases y grupos protectores de la estructura principal: Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con 2 mL de 1-metil-2-pirrolidinona. Se agregó un mL de una solución de escisión que consistía en 1,4-ditiotreitol (DTT) 0.1 M y trietilamina 0.73 M en 1-metil-2-pirrolidinona, la columna se tapó, y se dejó asentar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de ese tiempo, la solución se drenó en un vial Wheaton de 12 mL. La resina mayormente encogida se lavó dos veces con 300 µL de solución de escisión. A la solución se agregó 4.0 mL de amoníaco acuoso concentrado (almacenado a -20 °C), el vial se tapó herméticamente (con tapa roscada forrada de Teflón), y la mezcla se agitó para mezclar la solución. El vial se colocó en un horno a 45 °C durante 16-24 h para efectuar la escisión de la base y loa grupos protectores de la estructura principal.

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

Desmetoxitritilación de oligómeros de morfolino: Las fracciones combinadas de la purificación de Macroprep se trataron con H_3PO_4 1 M para reducir el pH a 2.5. Después de la mezcla inicial, las muestras se asentaron a temperatura ambiente durante 4 min, en cuyo momento se neutralizaron a pH 10-11 con amoníaco 2.8 %/agua. Los productos se purificaron por extracción

de la fase sólida (SPE):

Acondicionamiento y empaquetado de columna de SPE: Amberchrome CG-300M (Rohm y Haas; Filadelfia, PA) (3 mL) se empaquetó en columnas de frita de 20 mL (columnas de cromatografía de Econo-Pac BioRad (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/etanol al 20 %; agua; NH_4OH al 0.28 %.

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

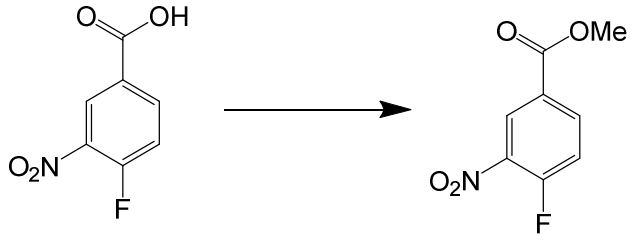
Aislamiento del producto: Las soluciones se congelaron en hielo seco y los viales se colocaron en una secadora por congelación para producir un polvo blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en agua, se filtraron a través de un filtro de 0.22 micras (Pall Life Sciences, filtro de jeringa de 25 mm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

Análisis de oligómeros de morfolino mediante MALDI: Se usó espectrometría de masas de MALDI-TOF para determinar la composición de fracciones en las purificaciones, así como también proporcionar evidencia para la identidad (peso molecular) de los oligómeros. Las muestras se corrieron después de la dilución con solución de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), 3,4,5-trihidroxiacetofenona (THAP) o ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) como matrices.

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**)

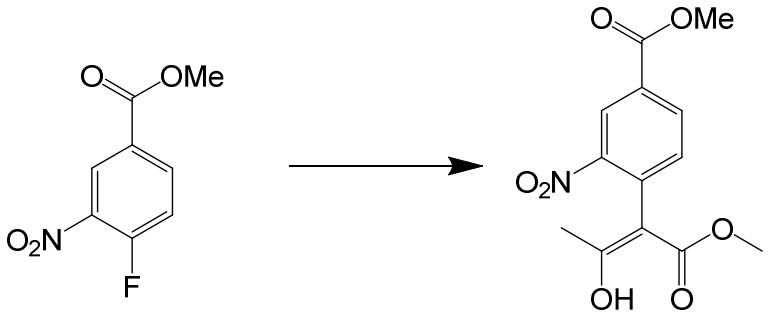


1

A un matraz de 100 L cargado con 12.7 kg de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico se agregó 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 hasta 0 °C. Los cristales se formaron a 38 °C. La mezcla se mantuvo a 0° C durante 4 h, después se filtró con nitrógeno. El matraz de 100 L se lavó y la torta de filtración se lavó con 10 kg de metanol que se había enfriado hasta 0 °C. La torta de filtración sólida se secó en el embudo durante 1 hora, se transfirió a bandejas, y se secó en un horno al vacío a temperatura ambiente a un peso constante de 13.695 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (100 % de rendimiento; HPLC 99 %).

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**)

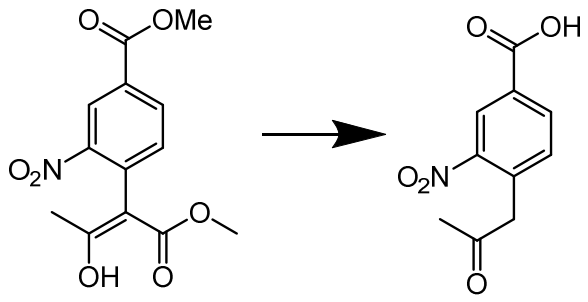


1 **2**

Un matraz de 100 L se cargó con 3.98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (**1**) de la etapa previa, 9.8 kg de DMF, 2.81 kg de acetoacetato de metilo. La mezcla se agitó y se enfrió hasta 0 °C. A esto se le agregó 3.66 kg de DBU durante alrededor de 4 horas mientras la temperatura

se mantuvo igual o inferior a 5 °C. La mezcla se agitó durante 1 hora adicional. Al matraz de reacción se le agregó una solución de 8.15 kg de ácido cítrico en 37.5 kg de agua purificada mientras la temperatura de reacción se mantuvo igual o inferior a 15 °C. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos adicionales, después se filtró con nitrógeno. La torta de filtración húmeda se regresó al matraz de 100 L junto con 14.8 kg de agua purificada. La suspensión se agitó durante 10 minutos, después se filtró. La torta húmeda se regresó nuevamente al matraz de 100 L, se sometió a suspensión con 14.8 kg de agua purificada durante 10 minutos, y se filtró en 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metilo crudo.

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

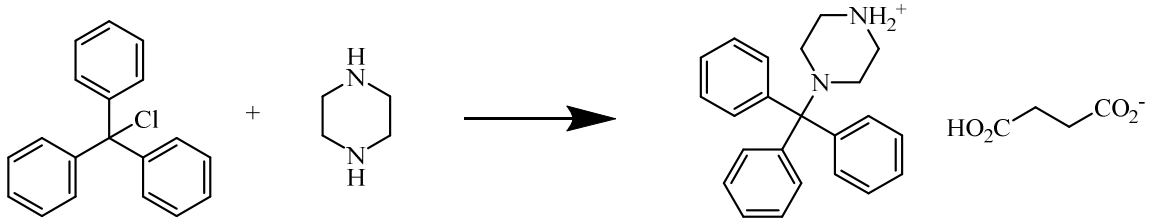


2 3

El 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metilo crudo se cargó en un matraz de reacción de 100 L con nitrógeno. A esto se le agregó 14.2 kg de 1,4-dioxano y se agitó. A la mezcla se le agregó una solución de 16.655 kg de HCl concentrado y 13.33 kg de agua purificada (HCl 6 M) durante 2 horas, mientras la temperatura de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 15 °C. Cuando se completó la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo (80 °C) durante 24 horas, se enfrió hasta temperatura ambiente, y se filtró con nitrógeno. La torta de filtración 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. El sólido se regresó al matraz de 100 L con 39.9 kg de DCM y se sometió a reflujo con agitación durante 1 hora. Se agregó 1.5 kg de

agua purificada para disolver los sólidos restantes. La capa orgánica del fondo se dividió en un matraz de 72 L precalentado, después se regresó a un matraz de 100 L seco limpio. La solución se enfrió hasta 0 °C, se mantuvo durante 1 hora, después se filtró. La torta de filtración sólida se lavó dos veces cada una con una solución de 9.8 kg de DCM y 5 kg de heptano, después se secó en el embudo. El sólido se transfirió a bandejas y se secó a un peso constante de 1.855 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico. Rendimiento total 42 % del compuesto **1.** HPLC 99.45 %.

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



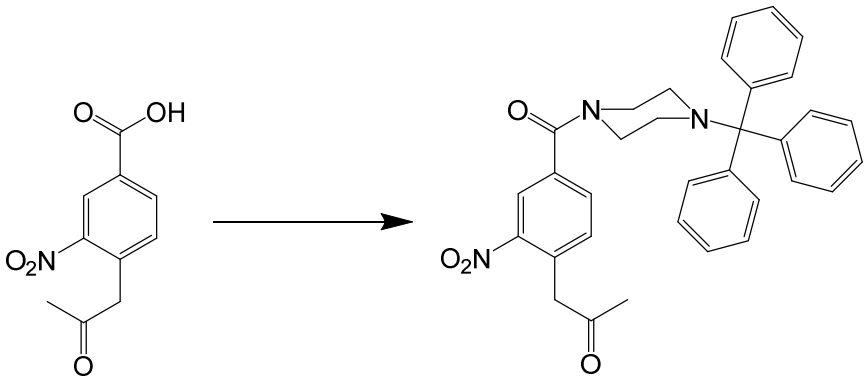
En un matraz recubierto de 72 L se cargó con nitrógeno con 1.805 kg de cloruro de trifenilmetilo y 8.3 kg de tolueno (solución de TPC). La mezcla se agitó hasta que los sólidos se disolvieron. A un matraz de reacción recubierto de 100 L se le agregó con nitrógeno 5.61 kg de piperazina, 19.9 kg de tolueno, y 3.72 kg de metanol. La mezcla se agitó y se enfrió hasta 0 °C. A esto se le agregó lentamente en partes la solución de TPC durante 4 horas mientras la temperatura de reacción se mantuvo igual o inferior a 10 °C. La mezcla se agitó durante 1.5 horas a 10 °C, después se dejó calentar hasta 14° C. Se cargaron 32.6 kg de agua purificada al matraz de 72 L, después se transfirió al matraz de 100 L mientras la temperatura del lote interno se mantuvo a 20 +/- 5 °C. Se permitió que las capas se dividieran y la capa acuosa del fondo se separó y se almacenó. La capa orgánica se extrajo tres veces con 32 kg de agua purificada cada una, y las capas acuosas se separaron y se combinaron con la solución acuosa almacenada.

La capa orgánica restante se enfrió hasta 18 °C y se agregó lentamente una solución de 847 g

de ácido succínico en 10.87 kg de agua purificada en partes a la capa orgánica. 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, después se secaron en el embudo. La torta de filtración se trituró dos veces con 5.7 kg cada uno de acetona y se filtró y se lavó con 1 kg de acetona entre trituraciones. El sólido se secó en el embudo, después se transfirió a bandejas y se secó en horno al vacío a temperatura ambiente a un peso constante de 2.32 kg de NTP. Rendimiento 80 %.

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

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

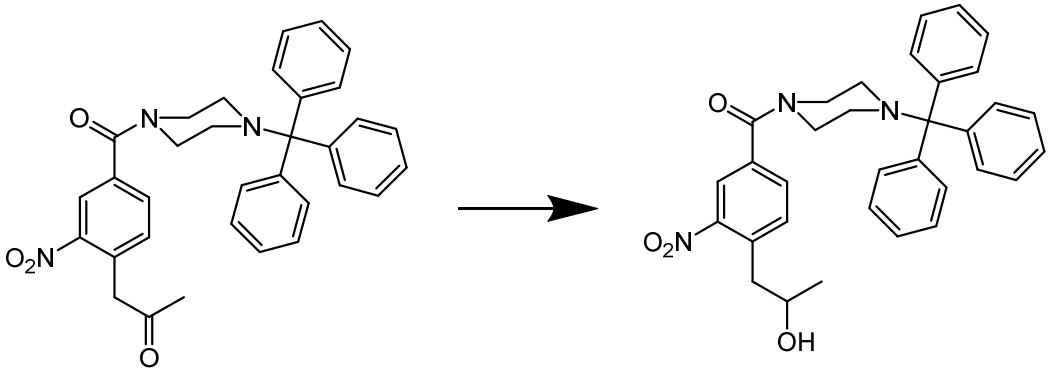


3 **4**

A un matraz recubierto de 100 L se cargó con nitrógeno con 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 agregó 3.048 kg de NTP durante 30 minutos a temperatura ambiente y se agitó por 8 horas. Se agregó 5.44 kg de agua purificada a la mezcla de reacción y se agitó durante 30 minutos. Se permitió que las capas se separaran y la capa orgánica del fondo que contenía el producto se drenó y almacenó. 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

sometieron a suspensión 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 evaporador rotatorio. Se agregaron 4.8 kg de THF al residuo y después se evaporaron en el evaporador rotatorio hasta que se alcanzaron 2.5 volúmenes de 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazina-1-carbonil)fenil)propan-2-ona cruda en THF.

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

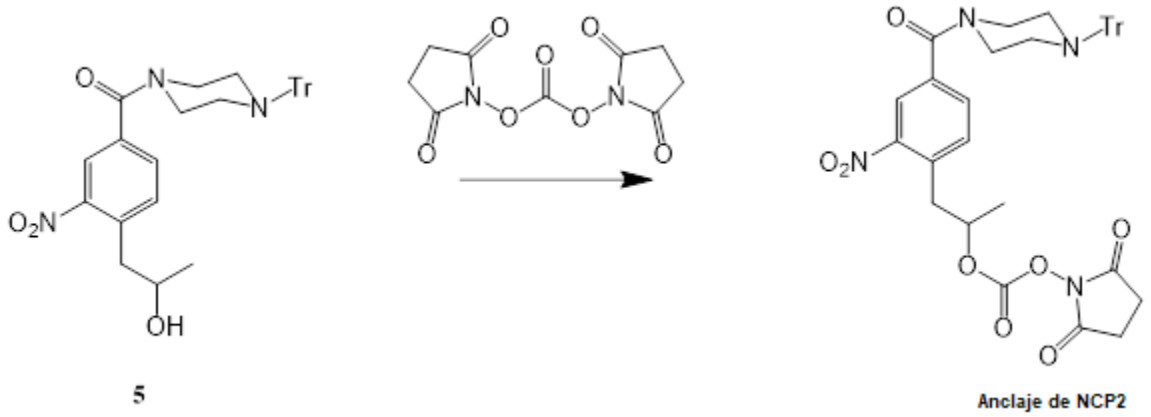


4 **5**

Un matraz recubierto de 100 L se cargó con nitrógeno con 3600 g de **4** de la etapa previa y 9800 g de THF. La solución agitada se enfrió hasta ≤ 5 °C. La solución se diluyó con 11 525 g de etanol y se agregaron 194 g de borohidruro de sodio durante alrededor de 2 horas a ≤ 5 °C. La mezcla de reacción se agitó unas 2 horas adicionales a ≤ 5 °C. La reacción se inactivó con una solución de alrededor de 1.1 kg de cloruro de amonio en alrededor de 3 kg de agua mediante adición lenta para mantener la temperatura a ≤ 10 °C. La mezcla de reacción se agitó unos 30 minutos adicionales, se filtró para remover los inorgánicos, y se recargó en un matraz recubierto de 100 L, 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 una. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de alrededor de 800 g de cloruro de sodio en alrededor de 3 kg de agua, después se secaron sobre 2.7 kg de sulfato de sodio. La suspensión

se filtró y la torta de filtración se lavó con 2 kg de DCM. Los filtrados combinados se concentraron hasta volúmenes de 2.0, se diluyeron con alrededor de 360 g de acetato de etilo, y se evaporaron. El producto crudo se cargó en una columna de gel de sílice de 4 kg de sílice empaquetada con DCM con 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 recuperó en 11.7 kg de tolueno. La solución de tolueno se filtró y la torta de filtración se lavó dos veces con 2 kg de tolueno cada una. La torta de filtración se secó a un peso constante de 2.275 kg del compuesto **5** (46 % de rendimiento del compuesto **3**) HPLC 96.99 %.

5. Preparación de 2,5-dioxopirrolidin-1-il(1-(2-nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazina-1-carbonil)fenil)propan-2-il)c arbonato (**Anclaje de NCP2**)



En un matraz recubierto de 100 L se cargó con nitrógeno con 4.3 kg del compuesto **5** (peso ajustado a base de tolueno residual por H^1 NMR; todos los reactivos posteriores se ajustaron en consecuencia) y 12.7 kg de piridina. A esto se cargó 3.160 kg de DSC (78.91 % en peso por H^1 NMR) mientras la temperatura interna se mantuvo a ≤ 35 °C. La mezcla de reacción se envejeció durante alrededor de 22 horas a ambiente, después se filtró. La torta de filtración se lavó con 200 g de piridina. En dos lotes, donde cada uno comprende 1/2 del volumen filtrado, el lavado de filtrado se cargó lentamente en un matraz recubierto de 100 L que contenía una solución de alrededor de 11 kg de ácido cítrico en alrededor de 50 kg de agua y se agitó

durante 30 minutos para permitir la precipitación del sólido. El sólido se recolectó 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.

Los sólidos combinados se cargaron en un matraz recubierto de 100 L 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 permitió que las capas se separaran y la capa acuosa se retiró. La capa orgánica se lavó con 10 kg de agua, se separó, y se secó sobre 3.5 kg de sulfato de sodio. El DCM se filtró, se evaporó, y se secó al vacío hasta 6.16 kg de **Anclaje de NCP2** (114 % de rendimiento).

Síntesis de resina cargada con anclaje de NCP2

En un reactor de síntesis de fase sólida de 75 L con una llave de paso de Teflón se cargó alrededor de 52 L de NMP y 2300 g de resina de aminometilpoliestireno. La resina se agitó en el NMP para hasta que se hinchó durante alrededor de 2 horas, después se drenó. La resina se lavó dos veces con alrededor de 4 L de DCM por lavado, después dos veces con 39 L de solución de neutralización por lavado, después dos veces con 39 L de DCM por lavado. La solución de anclaje de NCP2 se agregó lentamente a la solución de resina con 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 se agitó con 1/2 de la solución de formación de casquetas de DEDC durante 30 minutos, se drenó, y se trató y se agitó con la 2.ª 1/2 de la solución de formación de casquetes de DEDC durante 30 minutos y se drenó. La resina se lavó seis veces con 39 L de DCM por lavado, después se secó en un horno a peso constante de 3573.71 g de resina cargada de anclaje.

Preparación de oligómero de morfolino mediante el uso del anclaje de NCP2

Ejemplo representativo de una síntesis de fase sólida de 50 L de un PMO, **Golodirsen** (PMO-G; SEQ ID NO: 9), sustancia de fármaco crudo

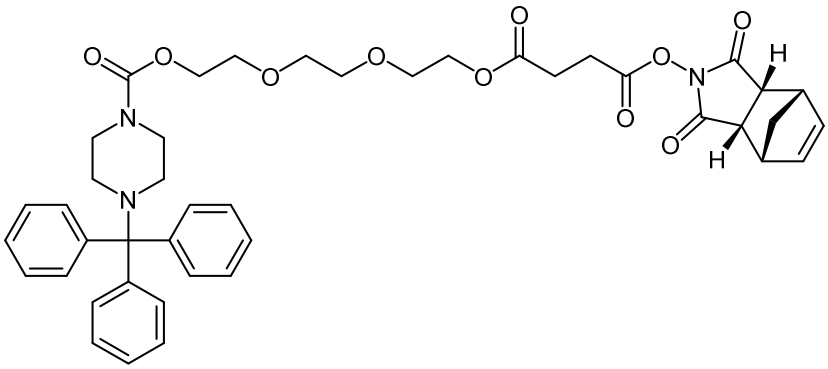
1. Materiales

Tabla 2: Materiales de Partida

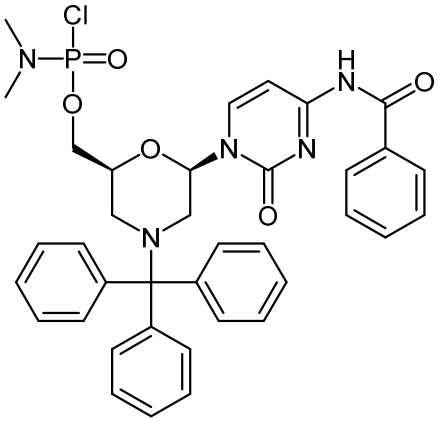
Nombre del material	Nombre químico	Número CAS	Fórmula química	Peso molecular
Subunidad A activada	Ácido fosforamidoclorídico, éster *N*,*N*-dimetil-,[6-[6-(benzoilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico	1155373-30-0	$C_{38}H_{37}ClN_7O_4P$	722.2
Subunidad C activada	Ácido fosforamidoclorídico, éster *N*,*N*-dimetil-,[6-[4-(benzoilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico	1155373-31-1	$C_{37}H_{37}ClN_5O_5P$	698.2
Subunidad DPG activada	Ácido propanoico, éster 2,2-dimetil-,4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino)pfosfinil]oxi]metil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenílico	1155309-89-9	$C_{51}H_{53}ClN_7O_7P$	942.2
Subunidad T activada	Ácido fosforamidoclorídico, éster *N*,*N*-dimetil-,[6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico	1155373-34-4	$C_{31}H_{34}ClN_4O_5P$	609.1
Cola EG3 activada	Ácido butanodioico, éster 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]etílico]	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765.9

Estructuras químicas de materiales de partida:

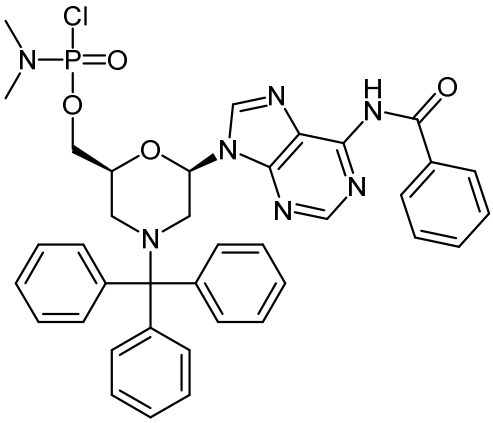
A. Cola EG3 activada



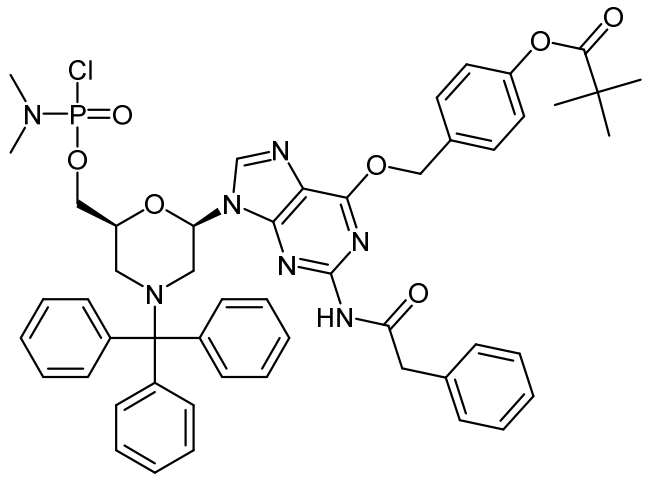
B. Subunidad C activada (para la preparación, véase la patente de EE. UU. n.º 8,067,571)



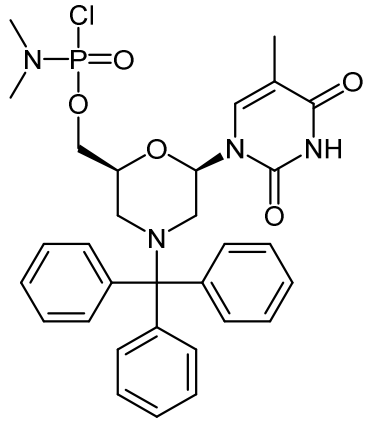
C. Subunidad A activada (para la preparación, véase la patente de EE. UU. n.º 8,067,571)



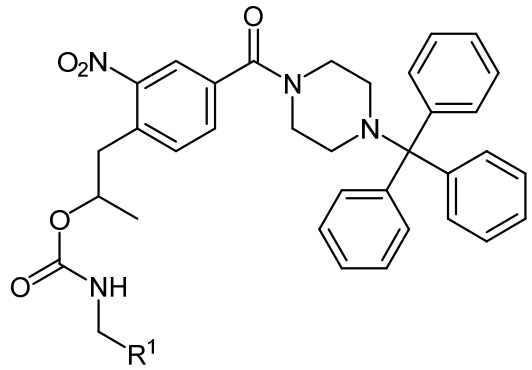
D. Subunidad DPG activada (para la preparación, véase WO 2009/064471)



E. Subunidad T activada (para la preparación, véase WO 2013/082551)



F. Resina cargada de anclaje



en donde R^1 es un medio de soporte.

Tabla 3: Descripción de soluciones para síntesis de oligómero de fase sólida de sustancia de

fármaco crudo Golodirsen

Nombre de la solución	Composición de la solución
Solución de anclaje de NCP2	37.5 L de NMP y 1292 g anclaje de NCP2
Solución de formación de casquetes de DEDC	4.16 L de dicarbonato dietílico (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	1530.04 g de DTT, 6.96 L de NMP, y 2.98 L de DBU

2. Síntesis de sustancia de fármaco crudo Golodirsen

A. Hinchamiento de la resina

750 g de resina cargada de anclaje y 10.5 L de NMP se cargaron a un reactor silanizado de 50 L y se agitó durante 3 horas. El NMP se drenó y la resina cargada de anclaje se lavó dos veces con 5.5 L cada una de DCM y dos veces con 5.5 L cada una de TFE al 30 %/DCM.

B. Ciclo 0: Acoplamiento de Cola de EG3

La Resina cargada de anclaje se lavó tres veces con 5.5 L cada una de TFE al 30 %/DCM 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 cual se cargó 122 mL de 1:1 de NEM/DCM 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 una de DCM y se drenó. Una solución de 706.2 g de cola EG3 activada (MW 765.85) y 234 mL de NEM en 3 L de DMI se cargó a la resina y se agitó durante 3 horas a TA y se drenó. La resina se lavó dos veces con 5.5 litros cada una de solución de neutralización durante 5 minutos por cada lavado, y una vez con 5.5 litros de DCM y se drenó. Una solución de 374.8 g de anhídrido benzoico y 195 mL de NEM en 2680 mL de NMP se cargó y se agitó durante 15 minutos y se drenó. La resina se agitó con 5.5 L de

solución de neutralización durante 5 minutos, luego se lavó una vez con 5.5 L de DCM y dos veces con 5.5 L cada una 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 de acoplamiento de subunidad 1-30

i. Tratamientos previos al acoplamiento

Antes de cada ciclo de acoplamiento, tal como se describe en la Figura 18, la resina: 1) se lavó con TFE al 30 %/DCM; 2) a) se trató con solución de CYTFA durante 15 minutos y se drenó, y b) se trató con solución de CYTFA durante 15 minutos, a lo que se agregó 1:1 de NEM/DCM, 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 posteriores al acoplamiento

Después de drenar 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. Si la resina se mantuvo durante un período de tiempo anterior al siguiente ciclo de acoplamiento, el segundo lavado de TFE/DCM no se drenó y la resina se retuvo en dicha solución de lavado de TFE / DCM. Véase la Figura 18.

iii. Ciclos de acoplamiento de subunidad activada

Los ciclos de acoplamiento se realizaron tal como se describe en la Figura 18.

iv. Lavado final de IPA

Después que se realizó la etapa de acoplamiento final, tal como se describe en Figura 18, la resina se lavó 8 veces con 19.5 L cada una de IPA, y se secó al vacío a temperatura ambiente durante alrededor de 63.5 horas a un peso seco de 4857.9 g.

C. Escisión

La sustancia de fármaco crudo Golodirsen unida a la resina anterior se dividió en dos lotes, cada lote se trató de la siguiente manera. Un lote de 1619.3 g de resina: 1) se agitó con 10 L de

NMP durante 2 horas, luego se drenó el NMP; 2) se lavó tres veces con 10 L cada una 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 lo que se agregó 130 ml de 1:1 de NEM/DCM, se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se trató tres veces con 10 L de solución de neutralización, se lavó seis veces con 10 L de DCM y ocho veces con 10 L de NMP. La resina se trató con una solución de escisión de 1530.4 g de DTT y 2980 DBU en 6.96 L NMP durante 2 horas para separar la sustancia de fármaco en crudo Eteplisen de la resina. La solución de escisión se drenó y se retuvo en un recipiente separado. El reactor y la resina se lavaron con 4.97 L de NMP que se combinó con la solución de escisión.

D. Desprotección

La solución de escisión combinada y el lavado de NMP se transfirieron a un recipiente de presión al cual se le agregó 39.8 L de NH_4OH (NH_3•H_2O) que se había enfriado hasta una temperatura de -10 °C a -25 °C en un congelador. El recipiente de presión se selló y se calentó hasta 45 °C durante 16 h, después se dejó enfriar hasta 25 °C. Esta solución de desprotección que contenía la sustancia de fármaco Golodirsen cruda se diluyó 3:1 con agua purificada y el pH se ajustó a 3.0 con ácido fosfórico 2 M, después a pH pH 8.03 con NH_4OH. HPLC: C18 77.552 % y SCX-10 73.768 %.

Purificación de sustancia de fármaco crudo **Golodirsen** (PMO-G)

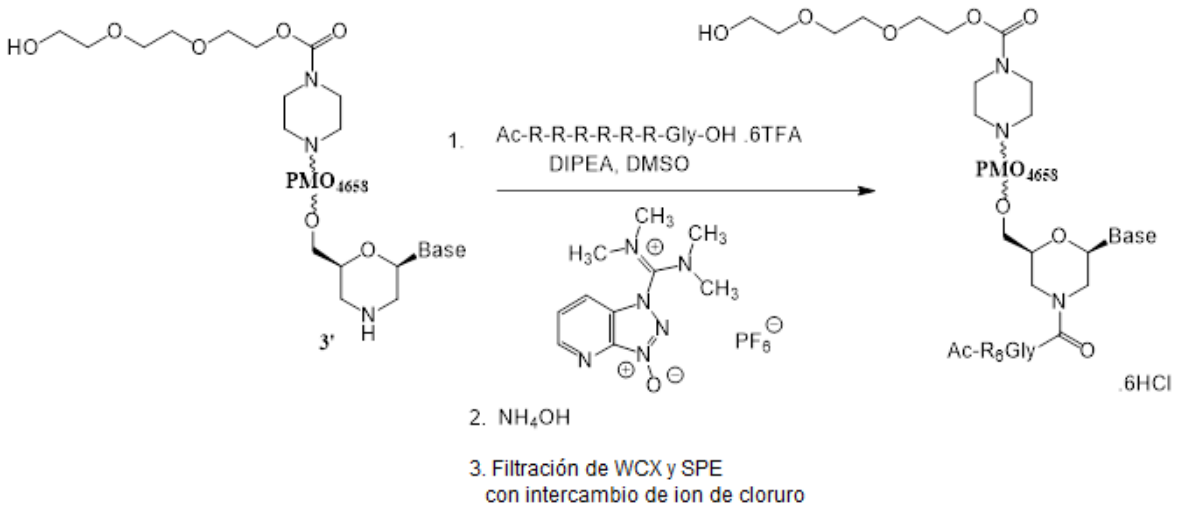
La solución de desprotección de la parte D anterior, que contenía la sustancia farmacéutica Golodirsen cruda, se cargó en una columna de resina de intercambio aniónico ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) y se eluyó con un gradiente de 0-35 % de B en un volumen de 17 columnas (amortiguador A : hidróxido de sodio 10 mM; amortiguador B: cloruro de sodio 1 M en hidróxido de sodio 10 mM) y las fracciones de pureza aceptable (C18 y SCX HPLC) se agruparon en una solución de producto farmacéutico purificada. HPLC: 93.571 % (C18), 88.270 % (SCX).

La solución de la sustancia de fármaco purificada se desaló y se liofilizó a 1450.72 g de la sustancia de fármaco Golodirsen purificada. Rendimiento de 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
MW	Peso molecular
NEM	N-Etilmorfolina
NMP	N-Metil-2-pirrolidona
TA	Temperatura ambiente
TFA	Ácido 2,2,2-trifluroacético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol

Ejemplo representativo de conjugación de CPP



Procedimientos analíticos: Los espectros de masas con tiempo de vuelo de ionización por

desorción asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) se registraron en una Bruker AutoflexTM Speed, mediante el uso de una matriz de ácido sinapínico (SA). La SCX-HPLC se realizó 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) mediante el uso de una velocidad de flujo de 1.0 ml/min (pH = 2; temperatura de la columna 30 ° C). 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 contenía KCl 1 M y H_3PO_4 24 mM). Se empleó elución en 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**.

A una mezcla del PMO4658 (1.82 g, 0.177 mmol, secada recientemente por liofilización durante dos días; SEQ ID NO: 10), Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH hexatrifluoroacetato (614.7 mg, 0.354 mmol), y hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[Bis(dimetilamino)metilen]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio (HATU, 134.4 mg, 0.354 mmol), se le agregó dimetilsulfóxido (DMSO, 20 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos, después se agregó *N*,*N*-diisopropiletilamina (DIPEA, 68.5 mg, 0.530 mmol). Después de 5 minutos, la mezcla turbia se volvió una solución transparente. La reacción se monitoreó mediante SCX-HPLC. Después de 2 horas, se agregó 20 mL de solución de hidróxido de amonio al 10 % (NH_3 al 2.8 %). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante unas 2 horas adicionales. La reacción se terminó mediante la adición de 400 mL de agua. Se agregó trifluoroetanol (2.0 mL) a la solución.

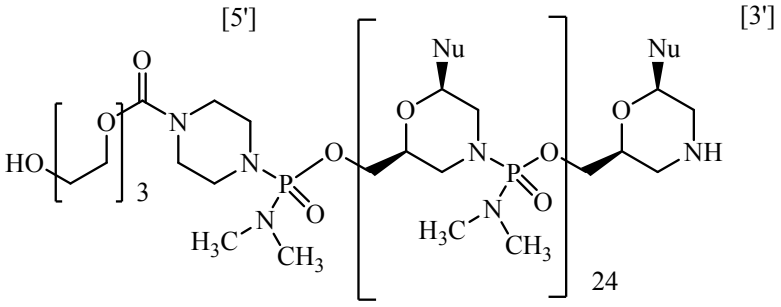
La solución se dividió en dos partes y cada parte se purificó mediante una columna WCX (10 g de resina por columna). Cada columna WCX se lavó primero con acetonitrilo al 20 % en agua (v/v) para eliminar el material de partida PMO4658. Los lavados (225 mL para cada columna) se detuvieron cuando el análisis de espectro de masas MALDI-TOF mostró la ausencia de señal de PMO4658. Cada columna se lavó con agua (100 mL por columna). El producto deseado, PPMO4658, se eluyó con HCl de guanidina 2.0 M (140 mL para cada columna). Las soluciones

purificadas de PPMO4658 se agruparon y luego se dividieron en dos partes y cada una se desaló mediante una columna de SPE (10 g de resina para cada columna).

La columna de SPE se lavó primero con una solución acuosa de NaCl 1.0 M (100 mL para cada columna) para generar la sal de hexahidrocloruro de PPMO46581. Cada columna de SPE se lavó con agua (200 mL para cada columna). El PPMO-G desalado final se eluyó con acetonitrilo al 50 % en agua (v/v, 150 mL para cada columna). El acetonitrilo se eliminó por evacuación a presión reducida. La solución acuosa resultante se liofilizó para obtener el hexahidrocloruro de PPMO4658 conjugado deseado (1.93 g, 94.5 % de rendimiento).

Ejemplo 1: PMO#1

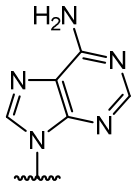
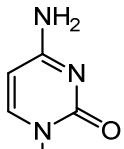
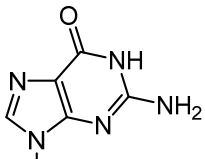
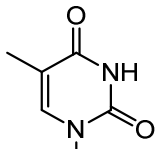
Mediante el uso del protocolo del método B de síntesis de PMO descrito anteriormente para PMO-G, se sintetizó PMO#1:



PMO#1

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

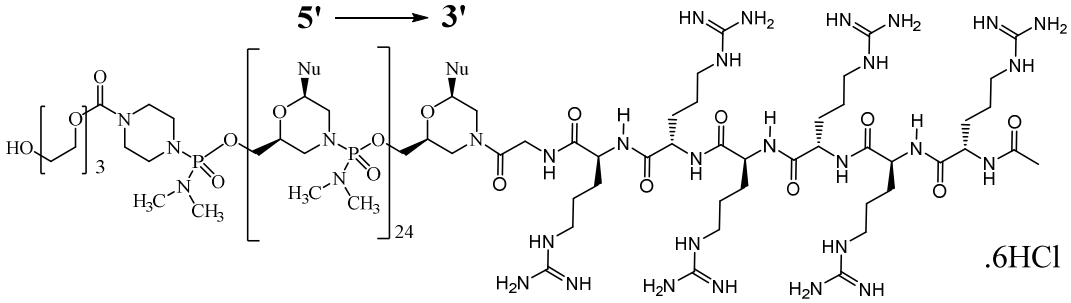
Posición n.º de 5’ a 3’	Nu	Posición n.º de 5’ a 3’	Nu	Posición n.º de 5’ a 3’	Nu	Posición n.º de 5’ a 3’	Nu	Posición n.º de 5’ a 3’	Nu
1	C	6	C	11	T	16	C	21	T
2	T	7	C	12	C	17	A	22	T
3	G	8	A	13	C	18	T	23	G
4	T	9	A	14	T	19	T	24	C
5	T	10	A	15	G	20	G	25	C

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

HPLC: 93.33 %;

Ejemplo 2: PPMO#1

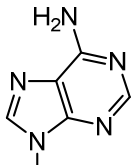
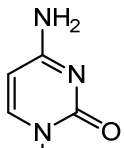
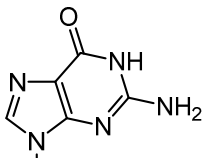
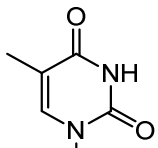
Mediante el uso del protocolo descrito anteriormente para la preparación de PPMO4658, se sintetizó PPMO#1 a partir de PMO#1:



PPMO#1

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

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

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

HPLC: 89.45 %.

Ejemplo 3: Salto del exón 52 *in vitro* (Mioblastos)

Dos compuestos que se dirigen al exón 52 de distrofina humana (*DMD*), tal como se describe en la tabla a continuación, PMO#1 y PPMO#1, que contienen la misma secuencia, se evaluaron con respecto al salto del exón 52 de *DMD* en mioblastos humanos sanos.

Secuencias de PMO#1 y PPMO#1 para el exón 52 de *DMD* humana.

Nombre	Secuencia objetivo (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#1	CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC	1	EG3	H
PPMO#1	CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC	1	EG3	-G-R_6

Específicamente, se colocaron mioblastos humanos sanos (pasaje 5-6, SKB-F-SL adquiridos en Zen-Bio, Inc.) en placas a 40 % de confluencia cuando se trataron con PMO#1 o PPMO#1 en varias 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 amortiguador de lisis RAI en el kit Ilustra GE RNAspin (Cat#25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). Se aisló el ARN total según la recomendación del fabricante, excepto que se usó 40 µL de agua libre de RNasa para eluir el ARN.

Para determinar el salto del exón 52 para ambos compuestos, se realizó un RT-PCR de punto final de dos etapas. Específicamente, en primer lugar, se transcribieron once microlitros de ARN total de forma inversa a ADNc mediante el kit de síntesis de la primera cadena SuperScript IV (Cat#18091200, Invitrogen) mediante el uso de hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. Se realizó la PCR mediante la adición de 9 µL de ADNc en Suprmix PCR de ADN polimerasa Taq Platino de alta fidelidad (Cat#12532024, Invitrogen) con el cebador directo que se dirige al exón 50 de *DMD* humana (cebador directo: (SEQ ID NO: 5): CTCTGAGTGGAAGGCGGTAA; y cebador inverso que se dirige al exón 53: (SEQ ID NO: 6):

ACCTGCTCAGCTTCTTCCTT). Se realizó la amplificación por PCR mediante el uso de un termociclador en tiempo real BioRad CFX96 mediante el uso del programa que se muestra en la Tabla 2. Se evaluó la expresión de los productos de PCR saltados y no saltados al cargar 32 µL del producto de PCR en el sistema LabChip GX mediante el uso del kit de reactivo de alta sensibilidad de ADN (CLS760672, Perkin Elmer). Se calculó el porcentaje de salto del exón 52 de *DMD* como el porcentaje de la molaridad (nmol/l) para la banda saltada del exón 52 (364 pb) en comparación con la suma de molaridad para las bandas saltadas (364 pb) y no saltadas (482 pb).

Se usó la prueba t de student no emparejada, de dos colas (homoscedástica) para evaluar si los medios de los 2 grupos son estadísticamente diferentes entre sí para cada dosis. Un valor $P < 0.05$ se considera estadísticamente significativo.

Programa de termociclador usado para amplificar amplicones de *DMD* con o sin salto del exón 52.

Etapa		Temperatura	Tiempo
1.	Desnaturalización	94 °C	2 min
2.	Desnaturalización	94 °C	30 s
3.	Hibridación	61.2 °C	30 s
4.	Extensión	68 °C	1 min
5.	Repetición de etapas 2-4	34 ciclos	
6.	Extensión final	68 °C	5 min
7.	Almacenamiento	4 °C	∞

Los resultados se presentan en la tabla a continuación y en la **Figura 4**. En la **Figura 4**, las barras de error presentan el promedio ± SD, "[*Número*] *x*" sobre las barras denota el múltiplo de cambio relativo en porcentaje de salto del exón mediante PPMO#1 en comparación con PMO#1 para cada concentración, y "*" indica una diferencia significativa entre PMO#1 y PPMO#1 con un valor $p < 0.05$.

Porcentaje de salto del exón 52 de DMD mediante PMO#1 y PPMO#1 en mioblastos

humanos.

Compuesto/dosis (µm)	Porcentaje de salto de exón (promedio ± SD)					
	1.25	2.5	5	10	20	40
PMO#1	0.7±0.089	1.36±0.25	2.19±0.21	4.05±1.30	6.94±1.85	12.94±1.21
PPMO#1	2.46±0.07	4.75±0.89	5.72±0.66	10.54±1.60	19.02±2.45	47.11±16.02

Los datos en la tabla anterior y en la **Figura 4,** sorprendentemente, muestran que el salto del exón 52 significativamente mayor produce mioblastos cuando las células se tratan con PPMO#1 en comparación con PMO#1 para todas las concentraciones, cuyo grado es inesperado. Es probable que esta mejora significativa pueda demostrarse, además, en una prueba comparativa *in vivo* tal como el estudio de primate no humano (NHP) del Ejemplo 5 donde los NHP son tratados con PPMO#1 o PMO#1 y el salto del exón 52 se mide en varios tejidos musculares pertinentes (véase el Ejemplo 5 por los detalles).

Ejemplo 4: Estudio en ratones MDX

El ratón mdx es un modelo de animal bien caracterizado y aceptado para 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 conoce por inducir el salto del exón 23 y restaurar la expresión de distrofina funcional. A los ratones MDX de 6-7 semanas de edad se les proporcionó una inyección única en la vena de la cola de PPMO4225 o PMO4225 de la tabla a continuación en una dosis de 40 mg/kg, o con solución salina.

Nombre	Secuencia objetivo (TS)	TS SEQ ID NO.	5’	3’
PMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	H
PPMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	-G-R_6

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

Se sacrificaron los ratones tratados a los 7, 30. 60 y 90 días después de la inyección de dosis única (n=6 por grupo). El diafragma, corazón y cuádriceps derecho se procesaron para análisis de transferencia western para medir la producción de proteína distrofina y análisis RT-PCR para medir el porcentaje del salto de exón, y los cuádriceps izquierdos se procesaron para inmunohistoquímica y tinción de H/E, tal como se describió anteriormente.

Se cuantificó la restauración de proteína distrofina por transferencia western, y porcentaje del salto de exón 23 se midió por RT-PCR, cada uno tal como se describió anteriormente.

Los resultados de RT-PCR y transferencia Western se muestran en las Figuras 5A-10B y en las tablas a continuación. Sorprendentemente, PPMO4225 indujo niveles sostenidos y significativamente mayores de restauración de distrofina y salto del exón 23 en comparación con PMO4225, donde los niveles más altos se produjeron 30 días después de la inyección. Incluyo más sorprendente, PPMO4225 aumentó los niveles de distrofina en el corazón cuando PMO4225 no lo hizo; no se observó distrofina y salto de exón en el corazón en todos los momentos con PMO4225.

	Cuantificación de proteína distrofina como porcentaje de proteína de tipo salvaje (% WT) mediante transferencia 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 salto de exón según se mide por 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

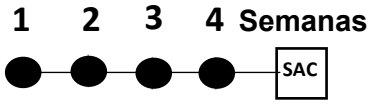
Diafragma	29.9	2.6	0.5	0	51.6	36.76	3.05	0
Corazón	0	0	0	0	13.15	2.64	0	0

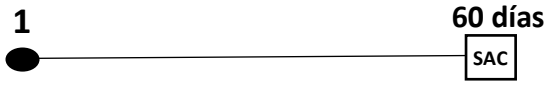
Los resultados de inmunohistoquímica se muestran en la Figura 11. Aquí, PPMO4225 restaura la distrofina a través de los cuádriceps, mientras que 4225 produce un patrón de expresión "similar a parche". La distribución uniforme de distrofina con el tratamiento con PPMO4225 indica que puede lograrse el direccionamiento extendido del músculo esquelético. PPMO4225 tiene un suministro significativamente mejorado sobre PMO4225 *in vivo*.

Ejemplo 5: Salto del exón 52 en NHP

Para demostrar adicionalmente la eficacia del salto de exón de los oligómeros antisentido de PPMO, se utilizaron primates no humanos. Específicamente, se inyectaron por vía intravenosa monos cynomolgus con tejidos musculares intactos, con PPMO#1, PMO#1 (del Ejemplo 3), o solución salina de conformidad con el programa de dosificación en la tabla a continuación:

Programa de dosificación de cynomolgus

Grupo	**Compuesto**	**Dosis (mg/kg)**	**Cantidad por grupo**	**Estrategia de suministro**
1	**PPMO#1**	**20**	**3**	 Una dosificación semanalmente, 4 dosis en total. Los animales se sacrificaron 48 horas después de la última dosis el día 22
2	**PPMO#1**	**40**	**3**	
3	**PPMO#1**	**80**	**3**	
4	**PPMO#1**	**160**	**3**	
5	**PMO#1**	**40**	**3**	
6	**Salina**	**0**	**2**	

7	**PPMO#1**	**40**	**2**	**Dosis única el día 1 con 4 semanas de recuperación**
8	**PPMO#1**	**40**	**2**	 **Dosis única el día 1 con 8 semanas de recuperación**

Los animales se observarán a lo largo del estudio, lo que incluye observaciones clínicas (por ejemplo, evaluación de la piel y el pelaje, efectos respiratorios) y mediciones del peso corporal. Se tomarán muestras de sangre y orina al menos antes del comienzo de la prueba y 24 horas después de la primera dosis y la última dosis (si corresponde).

En cada necropsia programada, o eutanasia *in extremis*, se recolectan secciones de diafragma, músculo liso del duodeno, esófago y aorta, cuádriceps, deltoides, bíceps y corazón, y se congelan instantáneamente. El porcentaje de salto del exón 52 se determina mediante el uso de RT-PCR, tal como se describió anteriormente.

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

A ratones MDX de 6-7 semanas de edad se les administró una inyección única en la vena de la cola de PPMO4225 o PMO4225 descrito anteriormente en una dosis de 40 mg/kg, 80 mg/kg o 120 mg/kg (n=6 por grupo).

Los ratones tratados se sacrificaron 30 días después de la inyección. El diafragma, el cuádriceps y el corazón se procesaron para el análisis de transferencia Western para medir la producción de proteína distrofina en base al protocolo de transferencia Western descrito anteriormente (utilizado, por ejemplo, en el Ejemplo 4) con las siguientes modificaciones:

Parámetro	Protocolo de transferencia Western del Ejemplo 4	Modificaciones al protocolo de transferencia Western
Cuantificación de proteína	Kit de ensayo de proteína RC DC	Método BCA
Etapa de bloqueo	Durante la noche a 4 °C	1 hora a TA
Incubación de anticuerpo primario	1 hora a TA	Durante la noche a 4 °C
Concentración de anticuerpo primario	1:20	1:500

La restauración de la proteína distrofina como % de tipo salvaje se presenta en la siguiente tabla y en las Figuras 12-15.

	Cuantificación de la proteína distrofina como porcentaje de proteína de tipo salvaje (%WT) por transferencia Western					
	Compuesto	**PMO4225**			**PPMO4225**		
	Dosis(mg/kg)	**40**	**80**	**120**	**40**	**80**	**120**
<u>Tejido</u>							
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

De manera sorprendente, los datos muestran que una dosis única de PPMO4225 aumenta los niveles de distrofina de manera dependiente de la dosis en ratones mdx en un grado significantemente y sustancialmente mayor que PMO4225.

Ejemplo 7: Estudio de IHC de diafragma y corazón en ratones MDX

A ratones MDX de 6-7 semanas de edad se les administró una inyección única en la vena de la cola de PPMO4225 en una dosis de 80 mg/kg o solución salina, y a los ratones de tipo salvaje de 6-7 semanas de edad se les administró una inyección única de solución salina. Los ratones

mdx tratados, los ratones mdx con solución salina y los ratones de tipo salvaje se sacrificaron 30 días después de la inyección de una dosis única (n=4 por grupo). Los resultados de la inmunohistoquímica se muestran en la Figura 19. Aquí, los resultados muestran un aumento uniforme de la distrofina en tejidos asociados con la morbilidad y mortalidad en DMD en ratones mdx tratados con PPMO4225.

****

Todas las publicaciones y solicitudes de patente citadas en esta memoria descriptiva se incorporan a la presente mediante referencia, como si se indicara específica e individualmente que cada publicación o solicitud de patente individual se incorpora mediante referencia.

REFERENCIAS

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

Abes, R., et ál. (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 ál. (2006). “Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology.” Nat. Med. **12**(2): 175-177.

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

Cirak, S., V. Arechavala-Gomeza, et ál. (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 ál. (1997). “Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides.” Nucleosides & Nucleotides **16**(7-9): 1665-1668.

Dunckley, M. G., M. Manoharan, et ál. (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 ál. (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 ál. (2011). “Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy.” N Engl J Med.

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

Jearawiriyapaisarn, N., et ál. (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 ál. (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 ál. (2008). “Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides.” Adv. Drug Deliv. Rev. **60:** 517-529.

Lu, Q. L., C. J. Mann, et ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina

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

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

Takeshima, Y., H. Nishio, et ál. (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 ál. (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 ál. (2007). “Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051.” N Engl J Med **357**(26): 2677-86.

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

Wilton, S. D., F. Lloyd, et ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (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 ál. (2006). “Stability of cell-penetrating peptide- morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells.” Am. Chem. Soc.

LISTADO DE SECUENCIA

Descripción	Secuencia de 5' a 3' o de extremo N a extremo C	SEQ ID NO
H52A(-01+24)	CTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC	1
mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R_6	RRRRRR	3
R_6-G	RRRRRRG	4
Cebador directo de unión al exón 50 humano	CTCTGAGTGGAAGGCGGTAA	5
Cebador directo de unión al exón 53 humano	ACCTGCTCAGCTTCTTCCTT	6
Cebador directo de unión al exón 23 de ratón	CACATCTTTGATGGTGTGAGG	7
Cebador inverso de unión al exón 23 de ratón	CAACTTCAGCCATCCATTTCTG	8
PMO-G	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	9
4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTTCTAG	10