

DESCRIPCIÓN

TÍTULO DE LA INVENCION INHIBIDOR DE SEÑAL DE MIOSTATINA

ARTE PREVIO**[0001]**

La miostatina también conocida como GDF8 se descubrió en 1997 como una citoquina novedosa que pertenece a la superfamilia TGF- β . La expresión tisular de la miostatina es específica en el músculo esquelético que es el tejido principal responsable de las actividades motoras y metabólicas. Los animales que alojan mutaciones de deficiencia de miostatina muestran hipertrofia muscular significativa donde la cantidad de músculo esquelético se incrementa a dos veces el tamaño de su contraparte de tipo natural (McPherron y colaboradores, Nature. 387(6628):83–90, 1997). Basado en esta observación, la miostatina se considera que sirve como un factor importante en controlar el volumen muscular esquelético.

[0002]

Cuando la miostatina transduce su señal al interior de una célula, se somete a un proceso diferente a TGF- β donde primero se une a un receptor tipo II, que luego se asocia con el receptor tipo I para formar un complejo de ligando-receptor. A través de este proceso cada uno de los receptores se somete a fosforilación en su dominio intercelular, que da por resultado la transducción de señal a través de la ruta dependiente de Smad o independiente de Smad (Chang y colaboradores, Endocrine Reviews. 23(6):787–823, 2002). Ambos receptores tipo I y II se codifican por múltiples genes, respectivamente. Cada molécula que pertenece a la superfamilia TGF- β se une a una combinación específica de receptores. La miostatina se une a una combinación de ALK4 o ALK5 para el receptor tipo I y ACVR2B para el receptor tipo II. Sin embargo, la combinación no es exclusiva a la miostatina, y se utiliza por algunas otras moléculas de la superfamilia TGF- β que incluyen GDF11, activina A, y etc. (Wakefield y Hill. Nat Rev Cancer.13(5):328–41, 2013, doi:10.1038/nrc3500. De esta manera, la unión de ligandos diferente a la miostatina a ACVR2B/ALK4 o ACVR2B/ALK5 puede desencadenar la transducción de señales supresoras al volumen muscular como lo hace la unión a miostatina. En realidad, se ha informado que la administración de un anticuerpo neutro contra ACVR2B o ACVR2B soluble en donde el dominio transmembrana y las regiones cadena abajo del mismo se reemplazan con un dominio de anticuerpo-Fc, a un ratón deficiente del gen de miostatina incrementa además el volumen muscular además del incremento provocado por la

deficiencia de miostatina (ver Lach-Trifilieff y colaboradores, Mol Cell Biol. 34(4):606–18, 2014. doi: 10.1128/MCB.01307–13; Lee y colaboradores, Proc Natl Acad Sci U S A. 102(50):18117–22, 2005). Este incremento adicional sugiere que existen factores adicionales a la miostatina que suprimen el volumen muscular al unirse a ACVR2B.

[0003]

Los medios para reducir la señalización de miostatina pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la atrofia muscular particular y otras enfermedades relacionadas con los músculos. La presente invención proporciona nuevos procedimientos para inhibir la señalización de miostatina a orientarse a ACVR2B en el nivel de ARNm.

SUMARIO DE LA INVENCION**[0004]**

De acuerdo con un primer aspecto de la invención se proporciona un compuesto que es capaz de permitir que una célula objetivo produzca un ARNm tipo 2B del receptor de activina mutante (ACVR2B) donde una parte de la secuencia de ARNm que codifica a algo o todo de la región intracelular del ACVR2B de tipo natural esté ausente.

[0005]

De acuerdo con una variación del primer aspecto de la invención se proporciona un compuesto que es capaz de provocar que una proteína tipo 2B del receptor de activina (ACVR2B) se produzca como una versión truncada mientras que carece de la parte de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de la misma.

[0006]

En formas de realización particulares, el compuesto es un oligonucleótido que es capaz de llevar a cabo la omisión del exón de uno o más de los exones, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B.

[0007]

De acuerdo a un segundo aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo del primer aspecto de la invención.

[0008]

De acuerdo a un tercer aspecto de la invención se proporciona el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo del primer aspecto de la invención o la composición farmacéutica del segundo aspecto de la invención para el uso en la terapia. En una forma de realización particular la terapia es la prevención o tratamiento de una enfermedad de atrofia muscular, una enfermedad sarcopénica o una enfermedad amiotrófica, tal como distrofia muscular de Duchenne.

[0009]

De acuerdo a un cuarto aspecto de la invención se proporciona un animal genéticamente manipulado que expresa un ACVR2B ARNm mutante que carece de una parte de la región intracelular de ACVR2B.

[0010]

Los aspectos y formas de realización particulares de la invención incluyen:

- [1] Un compuesto que es capaz de permitir que una célula objetivo produzca un ARNm tipo 2B de receptor de activina mutante (ACVR2B) donde una parte de la secuencia que codifica algo o todo de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural está ausente, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de la misma.
- [2] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo con [1], en donde la región intracelular de ACVR2B de tipo natural se codifica por los exones 5 a 11 de la ACVR2B de tipo natural.
- [3] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo con [1] o [2], que es capaz de hacer que la célula objetivo produzca una proteína ACVR2B truncada que carece de una parte de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural.
- [4] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo con [3], en donde la proteína ACVR2B truncada carece de todo o parte de la región intracelular codificada por al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B.
- [5] El compuesto de acuerdo con cualquiera de [1] a o [3], que es un oligómero antisentido capaz de introducir la omisión de un exón que codifica para una parte de la región intracelular de ACVR2B, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de la misma.

[6] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo con [5], en donde el exón que es omitido se selecciona del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B.

[7] El compuesto de acuerdo con [5] o [6], que comprende 10–50 nucleobases, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de las mismas.

[8] El compuesto de acuerdo con cualquiera de [5] a [7], que comprende una secuencia complementaria de 10 a 50 nucleótidos consecutivos de un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de las mismas.

[9] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo a cualquiera de [5] a [8], en donde el exón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 1 a 6.

[10] El compuesto de acuerdo con cualquiera de [5] a [9], que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionado del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

[11] El compuesto de acuerdo con cualquiera de [5] a [10], que consiste de una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

[12] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo a cualquiera de [5] a [11], en donde el oligómero antisentido es un oligonucleótido.

[13] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo con [12], en donde la al menos una porción de azúcar y/o al menos una porción de unión de fosfato en el oligonucleótido se modifica.

[14] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo con [13], en donde la porción de azúcar modificada es una ribosa en la cual el grupo -OH en la posición 2' se sustituye con cualquier grupo seleccionado del grupo que consiste de OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br y I (en donde R representa alquilo o arilo, y R' representa alquileno).

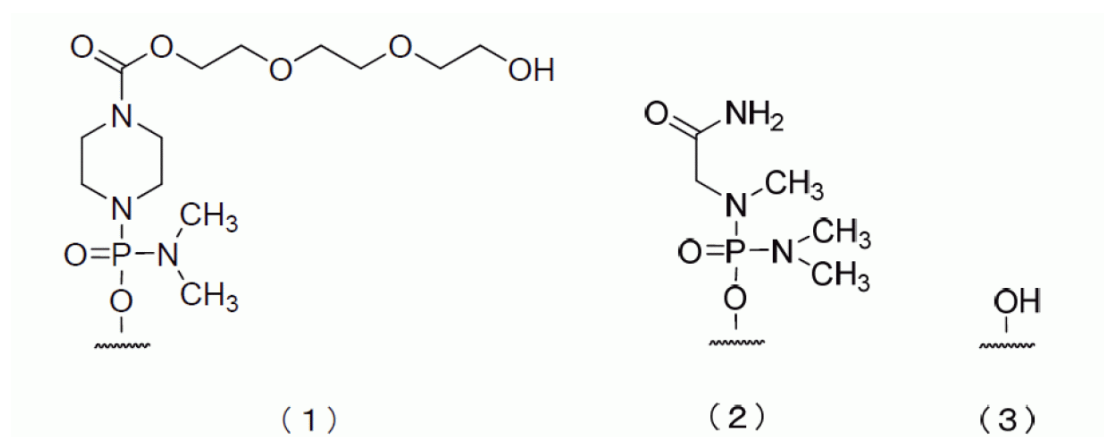
[15] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo con [13] o [14], en donde la porción de unión de fosfato modificada es una seleccionada

del grupo que consiste de una unión de fosforotioato, una unión de fosforoditioato, una unión de alquifosfonato, una unión de fosforoamidato y una unión de boranofosfato.

[16] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo a cualquiera de [5] a [11], en donde el oligómero antisentido comprende al menos un anillo de morfolino.

[17] El compuesto de acuerdo con [16], el cual es un oligómero de morfolino u oligómero de morfolino de fosfordiamidato, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

[18] El compuesto de acuerdo con [16] o [17], que tiene cualquiera de los grupos representados por las fórmulas químicas (1) a (3) mostradas a continuación en su extremo 5'-terminal, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.



[19] Un compuesto que es un conjugado en donde un péptido penetrante de células se une al compuesto de acuerdo con cualquiera de [1] a [18], o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

[20] Una composición farmacéutica que comprende el compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo a cualquiera de [1] a [19].

[21] La composición farmacéutica de acuerdo con [20], que comprende además al menos un portador o aditivo farmacéuticamente aceptable.

[22] La composición farmacéutica de acuerdo con [20] o [21], que es liofilizada.

[23] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo a cualquiera de [1] a [19] o la composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de [20] a [22] para el uso en la terapia en un sujeto.

[24] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo para uso o composición farmacéutica para el uso de acuerdo con [23], en donde la terapia es la prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica en un sujeto.

[25] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato para uso o composición farmacéutica para el uso de acuerdo con [24], en donde la enfermedad amiotrófica es distrofia muscular de Duchenne.

[26] El compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato para uso o composición farmacéutica para el uso de acuerdo a cualquiera de [23] a [25], en donde el sujeto es un humano.

[27] Un método para tratar una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica en un sujeto, que comprende que comprende administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo a cualquiera de [1] a [19] o la composición farmacéutica de acuerdo a cualquiera de [20] a [22].

[28] El método de acuerdo con [27], en donde la enfermedad amiotrófica es distrofia muscular de Duchenne.

[29] El método de acuerdo con [27] o [28], en donde el sujeto es un humano.

[30] Uso del compuesto o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo de acuerdo a cualquiera de [1] a [19] en la preparación de un medicamento para prevenir o tratar una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica en un sujeto.

[31] El uso de acuerdo con [30], en donde la enfermedad amiotrófica es distrofia muscular de Duchenne.

[32] El uso de acuerdo con [30] o [31], en donde el sujeto es un humano.

[33] Un animal genéticamente manipulado que expresa un ARNm tipo 2B de receptor de activina mutante (ACVR2B) donde una parte de la secuencia que codifica algo o todo de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural está ausente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0011]

La Figura 1 muestra la eficiencia de omisión (%) de cada exón por los oligómeros de morfolino de fosforodiamidato indicados (PMOs) (a y b), oligonucleótidos © de fosforotioato (PS) o un conjugado de péptido PMO (d).

La Figura 2 muestra la supresión de la señalización de miostatina por la expresión de ACVR2B truncada en donde la ACVR2B truncada se expresa predominantemente sobre la ACVR2B de tipo natural endógena.

La Figura 3 muestra la supresión de la expresión de SMAD7 ARNm que sirve como un índice de intensidad de señal de miostatina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0012]

La presente invención se describirá con más detalle a continuación. Las siguientes formas de realización se proponen para describir la presente invención por medio de ejemplo solamente y no se proponen limitar la presente invención solo a estas formas de realización. La presente invención se puede implementar en varios modos sin apartarse del espíritu de la presente invención. Las secuencias de nucleótidos son presentadas en una manera en donde el extremo 5' se coloca al extremo izquierdo y el extremo 3' se coloca al extremo derecho. Las secuencias de aminoácidos se presentan en una manera en donde la N-terminal se coloca en el extremo izquierdo y la C-terminal se coloca en el extremo derecho.

[0013]

Compuesto

La presente invención proporciona un compuesto que es capaz de permitir que una célula objetivo produzca un ARNm tipo 2B de receptor de activina mutante (ACVR2B) donde una parte de la secuencia de ARNm que codifica algo o todo de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural está ausente, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

[0014]

La proteína ACVR2B también es conocida como ActRIIB y consiste de 512 aminoácidos. La ubicación del mapa citogénico de ACVR2B es 3p22–p21.3. ACVR2B consiste de tres dominios principales, un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana, y un dominio de serina/treonina cinasa intracelular. Ishikawa y

colaboradores (*Journal of Human Genetics* volume 43, páginas 132–134 (1998)) informó que el gen ACVR2B contiene 11 exones y abarca aproximadamente 30 kb. La secuencia de ARNm de la ACVR2B humana de tipo natural (a partir de ahora referida como “ACVR2B de tipo natural”) se describe en la Secuencia de Referencia NCBI: NM_001106.4 y en donde en SEQ ID NO: 8.

[0015]

Una secuencia de codificación representativa (CDS) de la ACVR2B humana se muestra en SEQ ID NO: 10. Una secuencia de nucleótidos de ACVR2B CDS no se limita a la mostradas como SEQ ID NO: 10, e incluye secuencias variantes que tienen 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% de la longitud de SEQ ID NO: 10 y una identidad de secuencia de 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% a SEQ ID NO: 10.

[0016]

Una secuencia de aminoácidos representativa de la proteína ACVR2B humana se muestra en SEQ ID NO: 11. Una secuencia de aminoácidos de la proteína ACVR2B no se limita a la mostrada como SEQ ID NO: 11, e incluye secuencias variantes que tienen 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% de la longitud de SEQ ID NO: 11 y una identidad de secuencia de 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% a SEQ ID NO: 11.

[0017]

Cuando el compuesto de la presente invención se proporciona una célula que expresa ACVR2B, provoca que la célula produzca un ACVR2B ARNm mutante donde una parte de la secuencia de ARNm que codifica algo o todo de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural está ausente. Un “ACVR2B ARNm mutante” donde una parte de la secuencia de ARNm que codifica algo o todo de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural está ausente” (a partir de ahora referido como “el ACVR2B ARNm mutante de la presente invención” significa una ACVR2B ARNm mutante/variante que carece de una parte de la secuencia encontrada en la ACVR2B ARNm de tipo natural, y en donde la secuencia que está ausente con respecto a la ACVR2B de tipo natural codifica algo o toda de la región intracelular de ACVR2B de tipo natural, o un ACVR2B ARNm mutante que carece de una

parte de la secuencia encontrada en el ACVR2B ARNm de tipo natural que codifica algo o todo de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural.

[0018]

La región intracelular de la ACVR2B humana que consiste de 159 a 512 aminoácidos, inclusive, del lado N-terminal. Una secuencia ARNm que codifica algo o todo de la región intracelular de una ACVR2B de tipo natural representativa se muestra en SEQ ID NO: 9.

[0019]

El ACVR2B ARNm mutante de la presente invención puede carecer de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480,

481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000, 1001, 1002, 1003, 1004, 1005, 1006, 1007, 1008, 1009, 1010, 1011, 1012, 1013, 1014, 1015, 1016, 1017, 1018, 1019, 1020, 1021, 1022, 1023, 1024, 1025, 1026, 1027, 1028, 1029, 1030, 1031, 1032, 1033, 1034, 1035, 1036, 1037, 1038, 1039, 1040, 1041, 1042, 1043, 1044, 1045, 1046, 1047, 1048, 1049, 1050, 1051, 1052, 1053, 1054, 1055, 1056, 1057, 1058, 1059, 1060, 1061, 1062, 1063, 1064 o 1065 nucleótidos de SEQ ID NO:9.

[0020]

Como se muestra en la sección de ejemplos en la presente, la alteración de la región intracelular de la ACVR2B humana en el nivel de ARNm reduce de manera eficiente la señalización de miostatina. De esta manera, la región intracelular de ACVR2B es un buen objetivo para alterar la señal de miostatina.

[0021]

En una forma de realización, el compuesto de la presente invención es capaz de provocar que la célula objetivo produzca una proteína ACVR3B truncada que carece de una parte de la región intracelular de la proteína ACVR2B de tipo natural, por ejemplo tal como una con la secuencia en SEQ ID NO: 11.

[0022]

Como se utiliza en la presente, “proteína ACVR2B truncada que carece de una parte de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural” (a partir de ahora referida intercambiamente como “versión truncada de la proteína ACVR2B” o “proteína ACVR2B truncada”) se refiere a cualquier versión truncada de la proteína ACVR2B que carece de al menos un aminoácido en la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural. La parte de la región intracelular de ACVR2B que está ausente con respecto a la ACVR2B de tipo natural se refiere a uno o más aminoácidos presentes en la ACVR2B de tipo natural pero no en la ACVR2B truncada. Por ejemplo, la versión truncadas de la proteína ACVR2B puede carecer de 1 aminoácido, o 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270,

271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, o 354 aminoácidos de la región intracelular encontrada en la proteína ACVR2B de tipo natural, por ejemplo tal como la mostrada como SEQ ID NO: 11. Como será evidente, una versión/variante truncada no cubre simplemente las versiones que tienen uno o más aminoácidos eliminados de la carboxi o amino-terminal de la proteína sino también cubren las variantes que carecen de uno o más aminoácidos desde dentro de la proteína ACVR2B.

[0023]

La parte de la región intracelular de ACVR2B que está ausente o carece en la versión truncada se codifica por todo o parte de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de ACVR2B de tipo natural.

[0024]

Como se utiliza en la presente “capaz de provocar que la proteína ACVR2B se produzca como una versión truncada” significa que el compuesto de la presente invención permite que una célula a la cual el compuesto se agrega o sintetice o produzca una ACVR2B truncada como es explicado más completamente en la presente.

[0025]

Debido a que las regiones extracelulares y transmembrana de ACVR2B aún están presentes, la versión truncada de ACVR2B de la invención aún puede ser capaz de unirse a sus ligandos nativos, pero con respecto a la unión del ligando de miostatina, la eficiencia de traducción de la señal de miostatina se puede reducir comparada con aquella de ACVR2B de tipo natural. Ejemplos de ligandos nativos que pueden unir ACVR2B incluyen activina-A, activina-B, GDF1, GDF3, NODAL, GDF11, miostatina (que también es conocida como GDF8), BMP2, BMP5, GDF5 (que también es conocida como BMP14), GDF6, GDF7, BMP5, BMP6, BMP7 y BMP8. Un ejemplo preferido del ligando es la miostatina que también es conocida como GDF8.

[0026]

Como se utiliza en la presente “transducción” de una señal se propone para referirse a transmitir la señal al activar los factores cadena abajo relevantes a la señal, o al inactivar los factores cadena abajo relevantes a la señal.

[0027]

En una forma de realización particular, la versión truncada de la proteína ACVR2B de la invención es capaz de unirse a la miostatina.

[0028]

La proteína ACVR2B truncada de la invención transduce las señales tras la unión de un ligando a ACVR2B pero con menos intensidad que la ACVR2B de tipo natural. En una forma de realización, la proteína ACVR2B truncada transduce la señal de miostatina con menos intensidad que la ACVR2B de tipo natural tras la unión de la miostatina a la misma. Como se utiliza en la presente, el término “menos intensidad que la ACVR2B de tipo natural” se refiere a una reducción en la intensidad de la señal (capacidad de la señal) por 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% comparada con la intensidad de la señal transducida por la unión del mismo ligando a la ACVR2B de tipo natural. La intensidad de señal se puede determinar indirectamente al cuantificar el nivel de expresión de ARNm de uno o más genes cuya expresión se desencadena por la señal transducida. Por ejemplo, la intensidad de señal de la señalización desencadenada con miostatina se puede calibrar al medir el nivel de expresión de ARNm de SMAD7. En este caso, el compuesto de la presente invención es capaz de reducir la intensidad de la señal de miostatina a un nivel, que se correlaciona en una reducción del nivel de expresión de ARNm de SMAD7 por y 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%,

93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% comparada con aquella provocada por la señalización de miostatina de la ACVR2B de tipo natural.

[0029]

En otra forma de realización, el ACVR2B ARNm mutante de la presente invención puede carecer de una parte de la secuencia que codifica algo o todo de la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural debido a una mutación de desplazamiento de marco. Esta mutación de desplazamiento de marco puede generar un marco de lectura diferente cadena abajo del mismo que en el ARNm de tipo natural. De esta manera, en este caso, el ACVR2B ARNm mutante de la presente invención carece de una parte de la secuencia que codifica algo o todo de la región intracelular de ACVR2B de tipo natural.

[0030]

Este desplazamiento de marco también puede provocar que el ACVR2B ARNm mutante de la presente invención vaya a través de la descomposición del ARNm mediado sin sentido (NMD) de ACVR2B. NMD es un mecanismo para controlar la calidad de los ARNms que tienen todos los organismos eucariotas, y destruye los ARNms anormales que tienen un codón de detención en una posición cadena arriba (hacia el extremo 5') al codón de detención original, típicamente provocado a través de mutaciones. Cuando algunos exones, en particular los exones que tiene secuencias en la longitud de ninguno de los múltiples de los tres nucleótidos (es decir no 3N donde N es un número entero dado), a algunos se omitieron, el marco de traducción de los tripletos se desplaza, y esto puede generar un codón de detención novedoso en la dirección 5' al codón de detención original. Por ejemplo, cuando el exón 8 de ACVR2B se omite, los exones 7 y 9 se unen directamente. El marco de lectura en la unión de los exones 7 y 9, "AG/GTAG" se compone de 2 nucleótidos en la mayoría del extremo 3' del exón 7, es decir "AG", y 4 nucleótidos en la mayoría del extremo 5' del exón 9, es decir "GTAG". El AGG TAG codifica arginina (Arg) y un codón de detención, generando un ARNm similar a mutante sin sentido. Este ARNm mutante luego se puede destruir por NMD. Por otra parte, en la ACVR2B de tipo natural, el marco de lectura colocado en la punta de los exones 7 y 8, "AG/GGAU" se componen de 2 nucleótidos como máximo en el extremo 3' del exón 7, es decir "AG", y 4 nucleótidos como máximo en el extremo 5' del exón 8, es decir "GGAU". El AGG GAU codifica arginina (Arg) y ácido aspártico (Asp).

[0031]

En la situación de un nuevo codón de detención se genera debido a un desplazamiento de marco, el ACVR2B ARNm mutante de la presente invención se produce, pero luego se degrada/se descompone típicamente a través de NMD.

[0032]

Como se utiliza en la presente una “célula objetivo” es una célula a la cual el compuesto de la presente invención se introduce y puede ser cualquiera de las células que expresan ACVR2B (por ejemplo ACVR2B de tipo natural). El ejemplo de la célula objetivo incluye monocito, mioblasto, o célula de miotubo. En una forma de realización, la célula objetivo es una célula animal. En otra forma de realización, la célula objetivo es una célula de mamífero. En otra forma de realización, la célula objetivo es una célula humana.

[0033]

El compuesto de la presente invención es cualquier compuesto que sea capaz de provocar que ACVR2B ARNm y/o una proteína se produzcan como una versión truncada que carece de una parte de la región intracelular de ACVR2B de tipo natural. Ejemplos de compuestos adecuados de la presente invención incluyen: una secuencia de ARN guía CRISPR-CAS9 con la endonucleasa apropiada es capaz de escindir/eliminar una parte del gen ACVR2B que codifica una parte de la afección intracelular de la misma, un oligómero antisentido para la omisión de al menos un exón que codifica una parte de la región intracelular ACVR2B, y los compuestos del sistema loxP para inactivar una parte de un gen ACVR2B que codifica una parte de la región intracelular de la misma.

[0034]

Como se apreciaría por una persona de experiencia en la técnica, otras técnicas de edición de genes bien conocida tal como TALENs o salientes de Zinc (ZFN) también se podría implementar para generar una versión truncada de ACVR2B de la invención.

[0035]

Cuando la CRISPR-CAS9 se utiliza para inhibir la señal de miostatina, un ARN guía que tiene una secuencia complementaria a una secuencia objetivo del ADN genómico que codifica una ACVR2B o una parte de ACVR2B (por ejemplo la región intracelular de ACVR2B de tipo natural) se introduce a una célula objetivo, identificando de esta manera una secuencia objetivo que se escinde. La proteína Cas9 introducida a la célula objetivo escinde la parte de doble hebra compuesta del ADN genómico y el ARN guía. A través de un proceso para reparar el sitio de escisión, una mutación(es) es provocada por la

delección e/o inserción de nucleótidos, provocando de esta manera la inactivación de todo o parte de ACVR2B. Ejemplos de la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de exones, por ejemplo exones 1 a 11 de ACVR2B. Adecuadamente, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 o grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B. En una forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 9 y 10 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 9 y 10 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6 y 10 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5 y 6 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 7, 8 y 9 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 7 y 8 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es exón 5 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 6 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 7 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 8 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 9 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 10 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 11 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 7, 8, 9 y 10, o grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B. Alternativamente, los intrones pueden ser el objetivo de CRISPR-CAS9. Por ejemplo, los intrones 7 y 8 que intercalan el exón 8 se pueden escindir. Cuando los sitios escindidos están siendo reparados, el exón 8 puede estar ausente para generar el ARNm mutante suprimido del exón 8. Similarmente, los intrones 4 y 5, o intrones 5 y 6, o intrones 6 y 7, o intrones 8 y 9, o intrones 9 y 10, o intrones 10 y 11

pueden ser el objetivo para escisión. De esta manera, el compuesto de la presente invención puede ser un ARN guía para CRISPR-CAS9 como se describe en lo anterior, o un ADN (tal como un plásmido de expresión) que proporciona un ADN guía como su transcrita, o proteína CAS9 (o similar a Cas9), o un ADN (tal como un plásmido de expresión) que codifica y proporciona la proteína CAS9 (o similar a Cas9), o una combinación de las mismas.

[0036]

Cuando el ARNsi se utiliza para inhibir la señal de miostatina, un ARNsi designado para orientarse a una secuencia de ACVR2B ARNm se introduce a una célula objetivo. Cuando la hebra guía del ARNsi de esta manera introducida se hibrida a la secuencia objetivo, entonces la proteína RISC endógena en la célula objetivo identifica la parte de doble hebra compuesta de la hebra guía y la hebra de ARNm objetivo, y escinde la secuencia objetivo del ARNm. Al hacerlo de esta manera, el nivel de la proteína ACVR2B se reduce. De esta manera, en otra forma de realización, el compuesto de la presente invención puede ser un ARNsi o un ADN (tal como un plásmido de expresión) que proporciona un ARNsi como su transcrito.

[0037]*Oligómero antisentido*

Un ACVR2B ARNm mutante también se puede producir intracelularmente al poner en contacto la célula con un oligonucleótido antisentido (AON) capaz de inducir la omisión del exón de uno o más de los exones de ACVR2B que codifican la región intracelular de la proteína a la célula.

[0038]

En una forma de realización, el compuesto de la presente invención es un oligómero antisentido capaz de inducir la omisión de un exón que codifica para una parte de la región intracelular de ACVR2B (a partir de ahora referida como “el oligómero antisentido de la presente invención” o “el oligómero antisentido”). Adecuadamente, el exón que se omite es uno seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 o grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B. En una forma de realización, el exón que se omite es uno seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 9 y 10. En otra forma de realización, el exón que se omite es el exón 5. Todavía en otra forma de realización, el exón que se omite es el exón 6. Todavía en otra

forma de realización, el exón que se omite es el exón 7. Todavía en otra forma de realización, el exón que se omite es el exón 8. Todavía en otra forma de realización, el exón que se omite es el exón 9. Todavía en otra forma de realización, el exón que se omite es el exón 10. Todavía en otra forma de realización, el exón que se omite es el exón 11. Todavía en otra forma de realización, el exón que se omite es uno seleccionado del grupo que consiste de los exones 7, 8, 9 y 10, o grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B.

[0039]

Las secuencias de nucleótidos representativas de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 son aquellas mostradas como SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 no se van a limitar a aquellos mostrados en como SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, e incluyen secuencias variantes que tienen 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% de la longitud de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente y una identidad de secuencia de 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% a SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente.

[0040]

El término “capaz de inducir la omisión de un exón que codifica para una parte de la región intracelular de ACVR2B” significa que la siguiente unión del oligómero antisentido de la presente invención a su sitio objetivo de un exón que codifica para una parte de la región intracelular del transcripto (*por ejemplo*, pre-ARNm) del gen ACVR2B (*por ejemplo*, gen ACVR2B humano), el exón se empalma. Por ejemplo, si el oligómero antisentido de la presente invención se une a una parte del exón 6 de ACVR2B pre-ARNm, la secuencia de nucleótidos que corresponde al extremo 5' del exón cadena abajo al exón 6, es *decir* el exón 7, se empalma en el lado 3' de la secuencia de nucleótidos que corresponde al extremo 3' del exón cadena arriba al exón 6, es *decir* el exón 5. Esto es provocado por una alteración del mecanismo de empalme normal después de la unión del oligómero antisentido de la presente invención. El polipéptido ACVR2B codificado por el ARNm después incluida aminoácidos codificados por el exón 5 unido al exón 7, con aquellos codificados por el exón 6 que se omiten (ausentes) de la variante ACVR2B truncada.

[0041]

En este punto, el término “unión” significa que cuando el oligómero antisentido de la presente invención se pone en contacto con (por ejemplo, mezclado con) copias del transcripto del gen ACVR2B (por ejemplo gen ACVR2B humano), las secuencias complementarias se hibridan bajo las condiciones fisiológicas para formar un ácido nucleico de doble hebra. El término “bajo condiciones fisiológicas” se refiere a condiciones que imitan el entorno *in vivo* en términos de pH, composición de sal y temperatura. Las condiciones adecuadas pueden ser cualquier combinación de la siguiente temperatura, pH y concentración de sal:

Temperatura: 25°C a 40°C, 35°C a 38°C, 36°C a 38°C, o 37°C;

pH: pH 5 a 8, pH 6 a 8, pH 7 a 8, o pH 7.4; y

concentración de sal: 100 a 200 mM, 130 a 170 mM, 140 a 160 mM, o 150 mM de concentración de cloruro de sodio.

[0042]

Como se utiliza en la presente, “identidad de secuencia” y “homología” con respecto a una secuencia de nucleótidos se refiere al porcentaje de residuos de nucleótidos en una secuencia objetivo candidato que son idénticos con los residuos de nucleótidos en una presente secuencia de nucleótidos, después de alinear las secuencias y permitir los espacios, si es necesario, para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo, y no considerando ninguna de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia. La alineación para propósitos de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos se puede lograr de varias formas que está dentro de la experiencia de uno en la técnica, por ejemplo, utilizando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ClustalW2, ALIGN o MEGALIGN™ (DNASTAR). Aquellos expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos cualquiera de los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, la identidad de secuencia de dos o más secuencias de nucleótidos se puede determinar al utilizar el algoritmo de Karlin y Altschul, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264–2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993). Basado en el algoritmo de BLAST, se han desarrollado los programas llamados BLASTN y BLASTX (Altschul SF, y colaboradores: J Mol Biol 215: 403, 1990). Si el BLASTN se utiliza para el análisis de secuencia de nucleótidos, los parámetros se pueden ajustar a, por ejemplo, puntuación = 100 y longitud de palabra =

12. Si se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar parámetros predeterminados en cada programa.

[0043]

El oligómero antisentido de la presente invención es un oligonucleótido y oligonucleótido modificado. Como se utiliza en la presente, un “oligonucleótido” es una secuencia de nucleótidos ligados de una longitud como se define a continuación que puede o no incluir modificaciones. Un oligonucleótido modificado se describe con detalle en cualquier parte.

[0044]

El oligómero antisentido de la presente invención puede tener una longitud de 10 a 70 nucleótidos, tal como: 11 a 70, 12 a 70, 13 a 70, 14 a 70, 15 a 70, 16 a 70, 17 a 70, 18 a 70, 19 a 70, 20 a 70, 21 a 70, 22 a 70, 23 a 70, 24 a 70, 25 a 70, 10 a 65, 11 a 65, 12 a 65, 13 a 65, 14 a 65, 15 a 65, 16 a 65, 17 a 65, 18 a 65, 19 a 65, 20 a 65, 21 a 65, 22 a 65, 23 a 65, 24 a 65, 25 a 65, 10 a 60, 11 a 60, 12 a 60, 13 a 60, 14 a 60, 15 a 60, 16 a 60, 17 a 60, 18 a 60, 19 a 60, 20 a 60, 21 a 60, 22 a 60, 23 a 60, 24 a 60, 25 a 60, 10 a 55, 11 a 55, 12 a 55, 13 a 55, 14 a 55, 15 a 55, 16 a 55, 17 a 55, 18 a 55, 19 a 55, 20 a 55, 21 a 55, 22 a 55, 23 a 55, 24 a 55, 25 a 55, 10 a 50, 11 a 50, 12 a 50, 13 a 50, 14 a 50, 15 a 50, 16 a 50, 17 a 50, 18 a 50, 19 a 50, 20 a 50, 21 a 50, 22 a 50, 23 a 50, 24 a 50, 25 a 50, 10 a 45, 11 a 45, 12 a 45, 13 a 45, 14 a 45, 15 a 45, 16 a 45, 17 a 45, 18 a 45, 19 a 45, 20 a 45, 21 a 45, 22 a 45, 23 a 45, 24 a 45, 25 a 45, 10 a 40, 11 a 40, 12 a 40, 13 a 40, 14 a 40, 15 a 40, 16 a 40, 17 a 40, 18 a 40, 19 a 40, 20 a 40, 21 a 40, 22 a 40, 23 a 40, 24 a 40, 25 a 40, 10 a 38, 11 a 38, 12 a 38, 13 a 38, 14 a 38, 15 a 38, 16 a 38, 17 a 38, 18 a 38, 19 a 38, 20 a 38, 21 a 38, 22 a 38, 23 a 38, 24 a 38, 25 a 38, 10 a 36, 11 a 36, 12 a 36, 13 a 36, 14 a 36, 15 a 36, 16 a 36, 17 a 36, 18 a 36, 19 a 36, 20 a 36, 21 a 36, 22 a 36, 23 a 36, 24 a 36, 25 a 36, 10 a 35, 11 a 35, 12 a 35, 13 a 35, 14 a 35, 15 a 35, 16 a 35, 17 a 35, 18 a 35, 19 a 35, 20 a 35, 21 a 35, 22 a 35, 23 a 35, 24 a 35, 25 a 35, 10 a 34, 11 a 34, 12 a 34, 13 a 34, 14 a 34, 15 a 34, 16 a 34, 17 a 34, 18 a 34, 19 a 34, 20 a 34, 21 a 34, 22 a 34, 23 a 34, 24 a 34, 25 a 34, 10 a 33, 11 a 33, 12 a 33, 13 a 33, 14 a 33, 15 a 33, 16 a 33, 17 a 33, 18 a 33, 19 a 33, 20 a 33, 21 a 33, 22 a 33, 23 a 33, 24 a 33, 25 a 33, 10 a 32, 11 a 32, 12 a 32, 13 a 32, 14 a 32, 15 a 32, 16 a 32, 17 a 32, 18 a 32, 19 a 32, 20 a 32, 21 a 32, 22 a 32, 23 a 32, 24 a 32, 25 a 32, 10 a 30, 11 a 30, 12 a 30, 13 a 30, 14 a 30, 15 a 30, 16 a 30, 17 a 30, 18 a 30, 19 a 30, 20 a 30, 21 a 30, 22 a 30, 23 a 30, 24 a 30, 25 a 30, 10 a 29, 11 a 29, 12 a 29, 13 a 29, 14 a 29, 15 a 29, 16 a 29, 17 a 29, 18 a 29, 19 a 29, 20 a 29, 21 a 29, 22 a 29, 23 a 29, 24 a 29, 25 a 29, 10 a

28, 11 a 28, 12 a 28, 13 a 28, 14 a 28, 15 a 28, 16 a 28, 17 a 28, 18 a 28, 19 a 28, 20 a 28, 21 a 28, 22 a 28, 23 a 28, 24 a 28, 25 a 28, 10 a 27, 11 a 27, 12 a 27, 13 a 27, 14 a 27, 15 a 27, 16 a 27, 17 a 27, 18 a 27, 19 a 27, 20 a 27, 21 a 27, 22 a 27, 23 a 27, 24 a 27, 25 a 27, 10 a 26, 11 a 26, 12 a 26, 13 a 26, 14 a 26, 15 a 26, 16 a 26, 17 a 26, 18 a 26, 19 a 26, 20 a 26, 21 a 26, 22 a 26, 23 a 26, 24 a 26, 25 a 26, 10 a 25, 11 a 25, 12 a 25, 13 a 25, 14 a 25, 15 a 25, 16 a 25, 17 a 25, 18 a 25, 19 a 25, 20 a 25, 21 a 25, 22 a 25, 23 a 25, 24 a 25, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 13 a 24, 14 a 24, 15 a 24, 16 a 24, 17 a 24, 18 a 24, 19 a 24, 20 a 24, 21 a 24, 22 a 24, 23 a 24, 10 a 23, 11 a 23, 12 a 23, 13 a 23, 14 a 23, 15 a 23, 16 a 23, 17 a 23, 18 a 23, 19 a 23, 20 a 23, 21 a 23, 22 a 23, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 13 a 22, 14 a 22, 15 a 22, 16 a 22, 17 a 22, 18 a 22, 19 a 22, 20 a 22, 21 a 22, 10 a 21, 11 a 21, 12 a 21, 13 a 21, 14 a 21, 15 a 21, 16 a 21, 17 a 21, 18 a 21, 19 a 21, 20 a 21, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 13 a 20, 14 a 20, 15 a 20, 16 a 20, 17 a 20, 18 a 20, 19 a 20, 10 a 19, 11 a 19, 12 a 19, 13 a 19, 14 a 19, 15 a 19, 16 a 19, 17 a 19, 18 a 19, 10 a 18, 11 a 18, 12 a 18, 13 a 18, 14 a 18, 15 a 18, 16 a 18, 17 a 18, 10 a 17, 11 a 17, 12 a 17, 13 a 17, 14 a 17, 15 a 17, 16 a 17, 10 a 16, 11 a 16, 12 a 16, 13 a 16, 14 a 16, 15 a 16, 10 a 15, 11 a 15, 12 a 15, 13 a 15 y 14 a 15 nucleótidos de su extremo 5' a su extremo 3' (a partir de ahora referido como "intervalo de longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención"). El oligómero antisentido de la presente invención puede tener una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 66, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, o 70 nucleótidos de su extremo 5' al extremo 3' (a partir de ahora referido como "longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención"). Los intervalos particularmente adecuados para la longitud del oligómero de la invención incluyen: 15 a 45, 17 a 35, 15 a 24, 15 a 26, y 20 a 40 nucleótidos de su extremo 5' al extremo 3'.

[0045]

El oligómero antisentido de la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una parte de la secuencia de nucleótidos de un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de ACVR2B o el grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B. la parte de la secuencia de nucleótidos de un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de ACVR2B o el grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B en la presente también es referida como "la secuencia objetivo". Las secuencias de nucleótidos representativas de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 son aquellas mostradas

como SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de los exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 no se limitan a aquellos mostrados como SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, e incluyen secuencias variantes que tienen 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% de identidad de secuencia a una secuencia descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. De esta manera, de acuerdo con las formas de realización particulares de la invención, el oligómero de la invención comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia con 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, o 100% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en cualquiera de SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente.

[0046]

La secuencia objetivo puede ser de cualquier longitud siempre y cuando sea la misma o más corta que la longitud del oligómero antisentido de la presente invención. Por ejemplo, la secuencia objetivo puede ser de la longitud de 10 a 70 nucleótidos, tal como: 11 a 70, 12 a 70, 13 a 70, 14 a 70, 15 a 70, 16 a 70, 17 a 70, 18 a 70, 19 a 70, 20 a 70, 21 a 70, 22 a 70, 23 a 70, 24 a 70, 25 a 70, 10 a 65, 11 a 65, 12 a 65, 13 a 65, 14 a 65, 15 a 65, 16 a 65, 17 a 65, 18 a 65, 19 a 65, 20 a 65, 21 a 65, 22 a 65, 23 a 65, 24 a 65, 25 a 65, 10 a 60, 11 a 60, 12 a 60, 13 a 60, 14 a 60, 15 a 60, 16 a 60, 17 a 60, 18 a 60, 19 a 60, 20 a 60, 21 a 60, 22 a 60, 23 a 60, 24 a 60, 25 a 60, 10 a 55, 11 a 55, 12 a 55, 13 a 55, 14 a 55, 15 a 55, 16 a 55, 17 a 55, 18 a 55, 19 a 55, 20 a 55, 21 a 55, 22 a 55, 23 a 55, 24 a 55, 25 a 55, 10 a 50, 11 a 50, 12 a 50, 13 a 50, 14 a 50, 15 a 50, 16 a 50, 17 a 50, 18 a 50, 19 a 50, 20 a 50, 21 a 50, 22 a 50, 23 a 50, 24 a 50, 25 a 50, 10 a 45, 11 a 45, 12 a 45, 13 a 45, 14 a 45, 15 a 45, 16 a 45, 17 a 45, 18 a 45, 19 a 45, 20 a 45, 21 a 45, 22 a 45, 23 a 45, 24 a 45, 25 a 45, 10 a 40, 11 a 40, 12 a 40, 13 a 40, 14 a 40, 15 a 40, 16 a 40, 17 a 40, 18 a 40, 19 a 40, 20 a 40, 21 a 40, 22 a 40, 23 a 40, 24 a 40, 25 a 40, 10 a 38, 11 a 38, 12 a 38, 13 a 38, 14 a 38, 15 a 38, 16 a 38, 17 a 38, 18 a 38, 19 a 38, 20 a 38, 21 a 38, 22 a 38, 23 a 38, 24 a 38, 25 a 38, 10 a 36, 11 a 36, 12 a 36, 13 a 36, 14 a 36, 15 a 36, 16 a 36, 17 a 36, 18 a 36, 19 a 36, 20 a 36, 21 a 36, 22 a 36, 23 a 36, 24 a 36, 25 a 36, 10 a 35, 11 a 35, 12 a 35, 13 a 35, 14 a 35, 15 a 35, 16 a 35, 17 a 35, 18 a 35, 19 a 35, 20 a 35, 21 a 35, 22 a 35, 23 a 35, 24 a 35, 25 a 35, 10 a 34, 11 a 34, 12 a 34, 13 a 34, 14 a 34, 15 a 34, 16 a 34, 17 a 34, 18 a 34, 19 a 34, 20 a 34, 21 a 34, 22 a 34, 23 a 34, 24 a 34, 25 a 34, 10 a 33, 11 a 33, 12 a 33, 13 a 33, 14 a 33, 15 a 33, 16 a 33, 17 a 33, 18 a 33, 19 a 33, 20 a 33, 21 a 33, 22 a 33, 23 a 33, 24 a 33, 25 a 33, 10 a 32, 11 a 32, 12 a

32, 13 a 32, 14 a 32, 15 a 32, 16 a 32, 17 a 32, 18 a 32, 19 a 32, 20 a 32, 21 a 32, 22 a 32, 23 a 32, 24 a 32, 25 a 32, 10 a 30, 11 a 30, 12 a 30, 13 a 30, 14 a 30, 15 a 30, 16 a 30, 17 a 30, 18 a 30, 19 a 30, 20 a 30, 21 a 30, 22 a 30, 23 a 30, 24 a 30, 25 a 30, 10 a 29, 11 a 29, 12 a 29, 13 a 29, 14 a 29, 15 a 29, 16 a 29, 17 a 29, 18 a 29, 19 a 29, 20 a 29, 21 a 29, 22 a 29, 23 a 29, 24 a 29, 25 a 29, 10 a 28, 11 a 28, 12 a 28, 13 a 28, 14 a 28, 15 a 28, 16 a 28, 17 a 28, 18 a 28, 19 a 28, 20 a 28, 21 a 28, 22 a 28, 23 a 28, 24 a 28, 25 a 28, 10 a 27, 11 a 27, 12 a 27, 13 a 27, 14 a 27, 15 a 27, 16 a 27, 17 a 27, 18 a 27, 19 a 27, 20 a 27, 21 a 27, 22 a 27, 23 a 27, 24 a 27, 25 a 27, 10 a 26, 11 a 26, 12 a 26, 13 a 26, 14 a 26, 15 a 26, 16 a 26, 17 a 26, 18 a 26, 19 a 26, 20 a 26, 21 a 26, 22 a 26, 23 a 26, 24 a 26, 25 a 26, 10 a 25, 11 a 25, 12 a 25, 13 a 25, 14 a 25, 15 a 25, 16 a 25, 17 a 25, 18 a 25, 19 a 25, 20 a 25, 21 a 25, 22 a 25, 23 a 25, 24 a 25, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 13 a 24, 14 a 24, 15 a 24, 16 a 24, 17 a 24, 18 a 24, 19 a 24, 20 a 24, 21 a 24, 22 a 24, 23 a 24, 10 a 23, 11 a 23, 12 a 23, 13 a 23, 14 a 23, 15 a 23, 16 a 23, 17 a 23, 18 a 23, 19 a 23, 20 a 23, 21 a 23, 22 a 23, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 13 a 22, 14 a 22, 15 a 22, 16 a 22, 17 a 22, 18 a 22, 19 a 22, 20 a 22, 21 a 22, 10 a 21, 11 a 21, 12 a 21, 13 a 21, 14 a 21, 15 a 21, 16 a 21, 17 a 21, 18 a 21, 19 a 21, 20 a 21, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 13 a 20, 14 a 20, 15 a 20, 16 a 20, 17 a 20, 18 a 20, 19 a 20, 10 a 19, 11 a 19, 12 a 19, 13 a 19, 14 a 19, 15 a 19, 16 a 19, 17 a 19, 18 a 19, 10 a 18, 11 a 18, 12 a 18, 13 a 18, 14 a 18, 15 a 18, 16 a 18, 17 a 18, 10 a 17, 11 a 17, 12 a 17, 13 a 17, 14 a 17, 15 a 17, 16 a 17, 10 a 16, 11 a 16, 12 a 16, 13 a 16, 14 a 16, 15 a 16, 10 a 15, 11 a 15, 12 a 15, 13 a 15 y 14 a 15 nucleótidos del extremo 5' al extremo 3'. La secuencia objetivo puede tener una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 66, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, o 70 nucleótidos de su extremo 5' al extremo 3'.

[0047]

La secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia objetivo (a partir de ahora referida como "secuencia de hibridación") debe ser la misma longitud como la secuencia objetivo. De esta manera, la longitud ejemplar de la secuencia de hibridación incluye:

10 a 70 nucleótidos, tal como 11 a 70, 12 a 70, 13 a 70, 14 a 70, 15 a 70, 16 a 70, 17 a 70, 18 a 70, 19 a 70, 20 a 70, 21 a 70, 22 a 70, 23 a 70, 24 a 70, 25 a 70, 10 a 65, 11 a 65, 12 a 65, 13 a 65, 14 a 65, 15 a 65, 16 a 65, 17 a 65, 18 a 65, 19 a 65, 20 a 65, 21 a 65, 22 a 65, 23 a 65, 24 a 65, 25 a 65, 10 a 60, 11 a 60, 12 a 60, 13 a 60, 14 a 60, 15 a

60, 16 a 60, 17 a 60, 18 a 60, 19 a 60, 20 a 60, 21 a 60, 22 a 60, 23 a 60, 24 a 60, 25 a 60, 10 a 55, 11 a 55, 12 a 55, 13 a 55, 14 a 55, 15 a 55, 16 a 55, 17 a 55, 18 a 55, 19 a 55, 20 a 55, 21 a 55, 22 a 55, 23 a 55, 24 a 55, 25 a 55, 10 a 50, 11 a 50, 12 a 50, 13 a 50, 14 a 50, 15 a 50, 16 a 50, 17 a 50, 18 a 50, 19 a 50, 20 a 50, 21 a 50, 22 a 50, 23 a 50, 24 a 50, 25 a 50, 10 a 45, 11 a 45, 12 a 45, 13 a 45, 14 a 45, 15 a 45, 16 a 45, 17 a 45, 18 a 45, 19 a 45, 20 a 45, 21 a 45, 22 a 45, 23 a 45, 24 a 45, 25 a 45, 10 a 40, 11 a 40, 12 a 40, 13 a 40, 14 a 40, 15 a 40, 16 a 40, 17 a 40, 18 a 40, 19 a 40, 20 a 40, 21 a 40, 22 a 40, 23 a 40, 24 a 40, 25 a 40, 10 a 38, 11 a 38, 12 a 38, 13 a 38, 14 a 38, 15 a 38, 16 a 38, 17 a 38, 18 a 38, 19 a 38, 20 a 38, 21 a 38, 22 a 38, 23 a 38, 24 a 38, 25 a 38, 10 a 36, 11 a 36, 12 a 36, 13 a 36, 14 a 36, 15 a 36, 16 a 36, 17 a 36, 18 a 36, 19 a 36, 20 a 36, 21 a 36, 22 a 36, 23 a 36, 24 a 36, 25 a 36, 10 a 35, 11 a 35, 12 a 35, 13 a 35, 14 a 35, 15 a 35, 16 a 35, 17 a 35, 18 a 35, 19 a 35, 20 a 35, 21 a 35, 22 a 35, 23 a 35, 24 a 35, 25 a 35, 10 a 34, 11 a 34, 12 a 34, 13 a 34, 14 a 34, 15 a 34, 16 a 34, 17 a 34, 18 a 34, 19 a 34, 20 a 34, 21 a 34, 22 a 34, 23 a 34, 24 a 34, 25 a 34, 10 a 33, 11 a 33, 12 a 33, 13 a 33, 14 a 33, 15 a 33, 16 a 33, 17 a 33, 18 a 33, 19 a 33, 20 a 33, 21 a 33, 22 a 33, 23 a 33, 24 a 33, 25 a 33, 10 a 32, 11 a 32, 12 a 32, 13 a 32, 14 a 32, 15 a 32, 16 a 32, 17 a 32, 18 a 32, 19 a 32, 20 a 32, 21 a 32, 22 a 32, 23 a 32, 24 a 32, 25 a 32, 10 a 30, 11 a 30, 12 a 30, 13 a 30, 14 a 30, 15 a 30, 16 a 30, 17 a 30, 18 a 30, 19 a 30, 20 a 30, 21 a 30, 22 a 30, 23 a 30, 24 a 30, 25 a 30, 10 a 29, 11 a 29, 12 a 29, 13 a 29, 14 a 29, 15 a 29, 16 a 29, 17 a 29, 18 a 29, 19 a 29, 20 a 29, 21 a 29, 22 a 29, 23 a 29, 24 a 29, 25 a 29, 10 a 28, 11 a 28, 12 a 28, 13 a 28, 14 a 28, 15 a 28, 16 a 28, 17 a 28, 18 a 28, 19 a 28, 20 a 28, 21 a 28, 22 a 28, 23 a 28, 24 a 28, 25 a 28, 10 a 27, 11 a 27, 12 a 27, 13 a 27, 14 a 27, 15 a 27, 16 a 27, 17 a 27, 18 a 27, 19 a 27, 20 a 27, 21 a 27, 22 a 27, 23 a 27, 24 a 27, 25 a 27, 10 a 26, 11 a 26, 12 a 26, 13 a 26, 14 a 26, 15 a 26, 16 a 26, 17 a 26, 18 a 26, 19 a 26, 20 a 26, 21 a 26, 22 a 26, 23 a 26, 24 a 26, 25 a 26, 10 a 25, 11 a 25, 12 a 25, 13 a 25, 14 a 25, 15 a 25, 16 a 25, 17 a 25, 18 a 25, 19 a 25, 20 a 25, 21 a 25, 22 a 25, 23 a 25, 24 a 25, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 13 a 24, 14 a 24, 15 a 24, 16 a 24, 17 a 24, 18 a 24, 19 a 24, 20 a 24, 21 a 24, 22 a 24, 23 a 24, 10 a 23, 11 a 23, 12 a 23, 13 a 23, 14 a 23, 15 a 23, 16 a 23, 17 a 23, 18 a 23, 19 a 23, 20 a 23, 21 a 23, 22 a 23, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 13 a 22, 14 a 22, 15 a 22, 16 a 22, 17 a 22, 18 a 22, 19 a 22, 20 a 22, 21 a 22, 10 a 21, 11 a 21, 12 a 21, 13 a 21, 14 a 21, 15 a 21, 16 a 21, 17 a 21, 18 a 21, 19 a 21, 20 a 21, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 13 a 20, 14 a 20, 15 a 20, 16 a 20, 17 a 20, 18 a 20, 19 a 20, 10 a 19, 11 a 19, 12 a 19, 13 a 19, 14 a 19, 15 a 19, 16 a 19, 17 a 19, 18 a 19, 10 a 18, 11 a 18, 12 a 18, 13 a 18, 14 a 18, 15 a 18, 16 a 18, 17 a 18, 10 a 17, 11 a 17, 12 a 17, 13 a 17, 14 a 17, 15 a

17, 16 a 17, 10 a 16, 11 a 16, 12 a 16, 13 a 16, 14 a 16, 15 a 16, 10 a 15, 11 a 15, 12 a 15, 13 a 15 y 14 a 15 nucleótidos del extremo 5' al extremo 3'. La secuencia de hibridación puede tener una longitud de 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 33, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 44, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 66, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, o 70 nucleótidos del extremo 5' al extremo 3'.

[0048]

Ejemplos de la secuencia de hibridación adecuada incluyen cualquiera de SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111. El oligómero antisentido de la presente invención puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste de cualquiera de SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111 (a partir de ahora referido como “una secuencia de hibridación adecuada” o “secuencias de hibridación adecuadas”).

[0049]

El oligómero antisentido de la presente invención puede no comprender necesariamente solo la secuencia de hibridación. Siempre y cuando el oligómero antisentido de la presente invención retenga la actividad de omisión para al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de ACVR2B o grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9, y 10 de ACVR2B, el oligómero antisentido de la presente invención puede comprender una secuencia parcial de las secuencias de hibridación adecuadas anteriores. En algunas formas de realización, el oligómero antisentido de la presente invención puede comprender 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las secuencias descritas en SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111. En otra forma de realización, el oligómero antisentido de la presente invención puede comprender al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 nucleótidos consecutivos de cualquiera de las secuencias descritas en SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111.

[0050]

El oligómero antisentido de la presente invención puede no comprender necesariamente solo la secuencia de hibridación. Siempre y cuando el oligómero antisentido de la presente invención retengan la actividad de omisión de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de ACVR2B o grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9, y 10 de ACVR2B, el oligómero antisentido de la presente

invención puede comprender una secuencia adicional (bases) que no complementan la región objetivo.

[0051]

Ejemplos de la secuencia tomada como objetivo por un oligómero antisentido de la presente invención incluye cualquier secuencia de exones, por ejemplo exones 1 a 11 de ACVR2B pre-ARNm. Adecuadamente, la secuencia objetivo incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 o grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B pre-mARN. En una forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-mARN incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 9 y 10. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 9 y 10. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6 y 10. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5 y 6. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 7, 8 y 9. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 7 y 8. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm es el exón 5. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm es el exón 6. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm es el exón 7. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm es el exón 8. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm es el exón 9. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm es el exón 10. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm es el exón 11. En otra forma de realización, la secuencia objetivo de ACVR2B pre-ARNm incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 7, 8, 9 y 10, o grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

[0052]

En una forma de realización particular el oligómero de la invención tiene una secuencia de hibridación que es de la misma longitud como el oligómero o más corta que el oligómero por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos. Por ejemplo, el oligómero puede ser de 24 nucleótidos en longitud y tiene una secuencia de hibridación que es de la misma longitud, es decir, todos los 24 nucleótidos en el oligómero complementa la región objetivo, o podrían tener una secuencia de hibridación que es 20 nucleótidos en longitud (4 más cortos que la longitud del oligómero) y el oligómero de esta manera también posee 4 nucleótidos que no complementan la región objetivo (y de esta manera no son parte de la secuencia de hibridación). Este oligómero, podría, por ejemplo, tener dos nucleótidos ya sea del lado de la secuencia de hibridación que no complementan la región objetivo, o 3 en un lado y uno en el otro, o 4 en un extremo.

[0053]

Además de la secuencia de hibridación o la secuencia de hibridación parcial, el oligómero antisentido de la presente invención puede comprender secuencias adicionales que pueden o no contribuir a hibridarse a la secuencia objetivo. Estas secuencias adicionales se pueden unir al extremo 5', extremo 3' o ambos extremos de la secuencia de hibridación o secuencia de hibridación parcial. En este caso la longitud total del oligómero antisentido de la presente invención se encuentra dentro del intervalo de longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención o la longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención.

[0054]

En otra forma de realización, el oligómero antisentido de la presente invención puede consistir de una secuencia de nucleótidos como se muestra en cualquiera de SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111. En algunas formas de realización, el oligómero antisentido de la presente invención puede consistir de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 nucleótidos consecutivos de una secuencia mostrada en cualquiera de SEQ ID NOs: 12 a 36 y 43 a 111.

En otra forma de realización, la presente invención proporciona un conjugado en donde un péptido funcional, *por ejemplo* péptido penetrante de células (CPP), se une al oligómero antisentido de la presente invención. El péptido funcional públicamente conocido o péptido funcional comercialmente disponible se puede utilizar en la presente invención. El péptido funcional que se puede utilizar en la presente invención incluye, por ejemplo, los péptidos ricos en arginina descritos en WO2008/036127; o los péptidos que

se orientan a los órganos descritos en WO2009/005793, tal como RXR, RBR y similar; o los péptidos que comprenden una subunidad de aminoácidos descrita en WO2012/150960. Los péptidos penetrantes de células (CPPs) representan secuencias de péptidos cortos de 10 a aproximadamente 30 aminoácidos que pueden cruzar la membrana plasmática de las células de mamífero y de esta manera pueden mejorar la administración del fármaco celular (ver, por ejemplo, Hum Mol Genet. 15 Ago 2011; 20(16): 3151–3160; Pharmacology & Therapeutics 154 (2015) 78–86). Los CPPs públicamente conocidos o los CPPs comercialmente disponibles se pueden utilizar en la presente invención. Los CPPs que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, por ejemplo; los CPPs listados en la Tabla 1 en la página 80 de Pharmacology & Therapeutics 154 (2015) 78–86, tal como TAT (48–60), penetratina, poliarginina, 4 Oct, WT1-pTj, DPV3, Transportano, MAP, VP22, Rep1, KW, KFGF, FGF12, Péptido de Intefrina β 3, C105Y, TP2; los CPPs listados en el párrafo [0085], Tabla 1 de JP-A-2017-500856 (WO2015/089487), tal como DPV10/6, DPV15b, YM-3, Tat, LR11, C45D18, Lyp-1, Lyp-2, BMV GAG, hLF1-22, C45D18, LR20; y similar. Los CPPs son comercialmente disponibles de, por ejemplo, Funakoshi, Co., Ltd. Los CPPs comercialmente disponibles tal como TAT (Funakoshi, Co., Ltd.), penetratina (Funakoshi, Co., Ltd.) y similar, o los CPPs públicamente conocidos tal como R8 y similar se pueden utilizar en la presente invención. Los CPPs preferidos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, por ejemplo, hLIMK, TAT, penetratina, R8 y similar (ver WO2016/187425, WO2018/118662, WO2018/118599, WO2018/118627, EBioMedicine 45 (2019) 630–645 etc.). El CPP se puede unir directamente al oligómero antisentido de la presente invención, o se puede unir a través de un ligador que se puede unir a CPP a un oligómero antisentido. Los ligadores públicamente conocidos se pueden utilizar en la presente invención. Estos ligadores incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en JP-A-2017-500856 (WO2015/089487), WO2015/089487, WO2009/073809, WO2013/075035, WO2015/105083, WO2014/179620, WO2015/006740, WO2017/010575, y similar. Los ligadores preferidos que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido 4-maleimidobutírico, un ligador que se puede unir al péptido funcional o el oligómero antisentido de la presente invención a través de una unión de disulfuro, y similar. Los conjugados de la presente invención se pueden reparar por un método públicamente conocido por una persona que tiene una experiencia ordinaria en la técnica.

[0055]

Eficiencia de la omisión:

Si o no un oligómero particular puede llevar a cabo la omisión de un exón o exones en el gen ACVR2B se puede evaluar o confirmar al introducir el oligómero antisentido de la presente invención en una célula que expresa ACVR2B (*por ejemplo*, una célula de rhabdomyosarcoma humano), que amplifica la región de ACVR2B ARNm que codifica para la región intracelular de ACVR2B de la ARN total de la célula de expresión ACVR2B por RT-PCR o análisis de secuencia en el producto amplificado por PCR.

[0056]

La eficiencia de la omisión se puede determinar como sigue: la solución de reacción RT-PCR se mide para el nivel de polinucleótidos “A” en el producto amplificado por PCR con la omisión del exón (*por ejemplo* la cantidad de ARNm de la ACVR2B truncada) y el nivel de polinucleótido “B” en el producto amplificado por PCR sin la omisión del exón (*por ejemplo* la cantidad de ARNm de ACVR2B de longitud completa), seguido por el cálculo basado en estos valores medidos de “A” y “B” de acuerdo con la siguiente ecuación.

Eficiencia de la omisión (%) = $\{A/(A + B)\} \times 100$

[0057]

En una forma de realización preferida, el oligómero antisentido de la presente invención provoca que la omisión del exón con una eficiencia de 10% o más, 15% o más, 20% o más, 25% o más, 30% o más, 35% o más, 40% o más, 45% o más, 50% o más, 55% o más, 60% o más, 62.5% o más, 65% o más, 67.5% o más, 70% o más, 72.5% o más, 75% o más, 77.5% o más, 80% o más, 82.5% o más, 85% o más, 87.5% o más, 90% o más, 92.5% o más, 95% o más, 97.5% o más, 98% o más o 99% o más. Una vez que el oligómero antisentido eficaz se identifica, una persona experta puede buscar e identificar una secuencia más óptima a diseñar una variedad de oligómeros antisentido que tienen las secuencias que se traslapan con la secuencia del oligómero antisentido eficaz, y los prueba utilizando los procedimientos como se describen en la presente.

[0058]

Oligonucleótido, oligómero de morfolino u oligómero de ácido nucleico peptídico:

El oligómero antisentido de la presente invención puede ser un oligonucleótido, un oligómero de morfolino o un oligómero de ácido nucleico peptídico (PNA), cada uno está en el intervalo de longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención o la longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención.

[0059]

El oligonucleótido anterior (a partir de ahora referido como “el oligonucleótido de la presente invención”) es un oligómero antisentido de la presente invención, cuya unidad constituyente es un nucleótido, y este nucleótido puede ser cualquiera de un ribonucleótido, un desoxiribonucleótido o un nucleótido modificado.

El oligonucleótido antisentido es típicamente de hebra individual.

[0060]

Un nucleótido modificado se refiere a un ribonucleótido o desoxiribonucleótido cuya nucleobase, porción de azúcar y porción de unión de fosfato todas se modifican en totalidad o en parte.

[0061]

En la presente invención, los ejemplos de una nucleobase incluyen adenina, guanina, hipoxantina, citosina, timina, uracilo, o base modificadas de las mismas. Estas bases modificadas se pueden ejemplificar por pseudouracilo, 3-metiluracilo, dihidrouracilo, 5-alquilcitosinas (por ejemplo, 5-metilcitosina), 5-alquiluracilos (por ejemplo, 5-etiluracilo), 5-halouracilos (por ejemplo, 5-bromouracilo), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidinas (por ejemplo, 6-metiluracilo), 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, 1-metiladenina, 1-metilhipoxantina, 2,2-dimetilguanina, 3-metilcitosina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5-metilaminometiluracilo, 5-metilcarbonilmetiluracilo, 5-metiloxiuracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético, 2-tiocitosina, purina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, isoguanina, indol, imidazol, xantina y etc., pero no se limitan a los mismos.

[0062]

Las modificaciones a la porción de azúcar se pueden ejemplificar por las modificaciones en la posición 2' de la ribosa y las modificaciones en las otras posiciones de azúcar. Ejemplos de modificaciones en la posición 2' de la ribosa incluyen modificaciones propuestas para reemplazar el grupo -OH en la posición 2' de la ribosa con OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br o I, en donde R representa alquilo o arilo, y R' representa alquilenos.

[0063]

Ejemplos de modificaciones en las otras posiciones de azúcar incluyen el reemplazo de O con S en la 4' de la ribosa o desoxiribosa, y la conexión entre las posiciones 2'- y 4' de azúcar, como es ejemplificado por LNAs (ácidos nucleicos bloqueados) o ENAs (ácidos nucleicos conectados con 2'-O,4'-C-etileno), pero no se limitan a los mismos.

[0064]

Las modificaciones a la porción de unión de fosfato se pueden ejemplificar por modificaciones y propuestas para reemplazar la unión de fosfodiéster con una unión de fosforotioato, una unión de fosforoditioato, una unión de alquifosfonato, una unión de fosforoamidato o una unión de boranofosfato (Enya y colaboradores: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154–9160) (ver, por ejemplo, JP WO2006/129594 y JP WO2006/038608).

[0065]

En la presente invención, el alquilo es de manera preferente un alquilo lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. Más específicamente, ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, ter-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, ter-pentilo, n-hexilo e isohexilo. Este alquilo se puede sustituir con 1 a 3 sustituyentes que incluyen halógeno, alcoxi, ciano, nitro, etc.

[0066]

En la presente invención, el cicloalquilo es de manera preferente un cicloalquilo que contiene de 5 a 12 átomos de carbono. Más específicamente, los ejemplos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo y ciclododecilo.

[0067]

En la presente invención, los halógenos incluyen flúor, cloro, bromo y yodo.

[0068]

El alcoxi puede ser un alcoxi lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, como es ejemplificado por metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, ter-butoxi, n-pentiloxi, isopentiloxi, n-hexiloxi, isohexiloxi, etc. Particularmente preferido es un alcoxi que contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

[0069]

En la presente invención, el arilo es de manera preferente un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono. De manera más específica, ejemplos incluyen fenilo, α -naftilo y β -naftilo. Particularmente preferido es fenilo. Este arilo se puede sustituir con 1 a 3 sustituyentes que incluyen alquilo, halógeno, alcoxi, ciano, nitro, etc.

[0070]

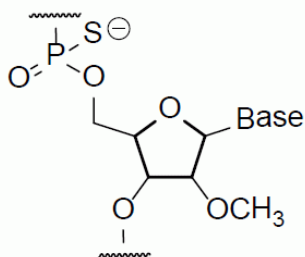
En la presente invención, el alquileo es de manera preferente un alquileo lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. De manera más específica, los ejemplos incluyen metileno, etileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno, 2-(etil)trimetileno y 1-(metil)tetrametileno.

[0071]

En la presente invención, el acilo puede ser un alcanilo lineal o ramificado o un aroilo. Ejemplos de este alcanilo incluyen formilo, acetilo, 2-metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, etc. Ejemplos de un aroilo incluyen benzoilo, toluoilo y naftoilo. Este aroilo se puede sustituir en cualquier posición sustituible y se puede sustituir con alquilo(s).

[0072]

El oligonucleótido de la presente invención es de manera preferente un oligómero antisentido de acuerdo con la presente invención, cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula general, en la cual el grupo -OH en la posición 2' de ribosa se sustituye con metoxi y la porción de unión de fosfato es una unión de fosforotioato:



(en donde la Base representa una nucleobase).

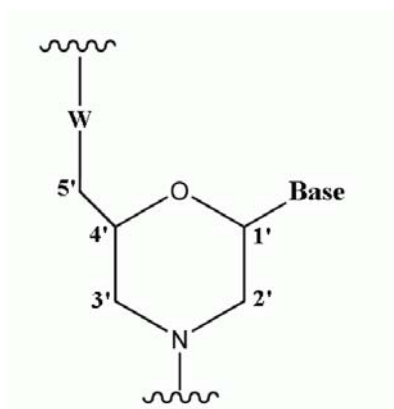
[0073]

El oligonucleótido de la presente invención se puede sintetizar fácilmente con varios sintetizadores automáticos (por ejemplo, FOCUS (Aapptec), AKTA oligopilot plus 10/100

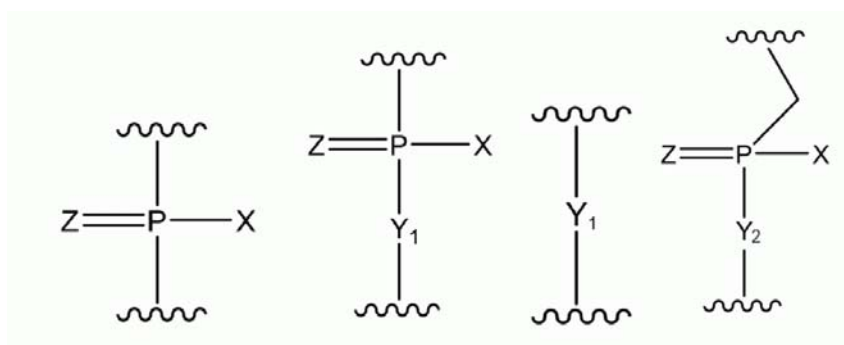
(GE Healthcare)), o alternativamente, su síntesis se puede conferir a un tercero (por ejemplo, Promega, Takara, o Japan Bio Services), etc.

[0074]

El oligómero de morfolino de la presente invención es un oligómero antisentido de acuerdo con la presente invención, cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula general:



(en donde Base es lo mismo como se define en lo anterior; y W representa un grupo representado por cualquiera de las siguientes fórmulas:



(en donde X representa $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ o F;

R^1 representa H o alquilo;

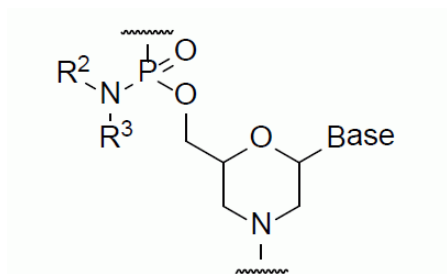
R^2 y R^3 , que pueden ser los mismos o diferentes, cada uno representa H, alquilo, cicloalquilo o arilo;

Y_1 representa O, S, CH_2 o NR^1 ;

Y_2 representa O, S o NR^1 ; y

Z representa O o S)).

El oligómero de morfolino es de manera preferente un oligómero cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula (es decir, un oligómero de morfolino de fosfordiamidato (a partir de ahora referido como “PMO”)):



(en donde Base, R^2 y R^3 son los mismos como se define en lo anterior).

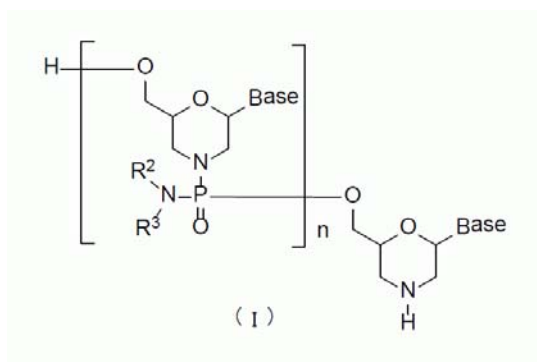
[0075]

Por ejemplo, el oligómero de morfolino se puede preparar de acuerdo con WO1991/009033 o WO2009/064471. En particular, PMO se puede preparar de acuerdo con los procedimientos descritos en WO2009/064471 o se puede preparar de acuerdo con los procedimientos mostrados a continuación.

[0076]

[Proceso para la preparación de PMO]

Como una forma de realización de un PMO, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) (a partir de ahora referido como PMO (I)) se puede dar por medio de ejemplo:



[en donde cada Base, R^2 y R^3 son los mismos como se define en lo anterior; y n es un número entero en el intervalo de 1 a 99, de manera adecuada cualquier número entero en el intervalo de 13 a 29, 14 a 28 o 15 a 27, 16 a 26, 17 a 25].

[0077]

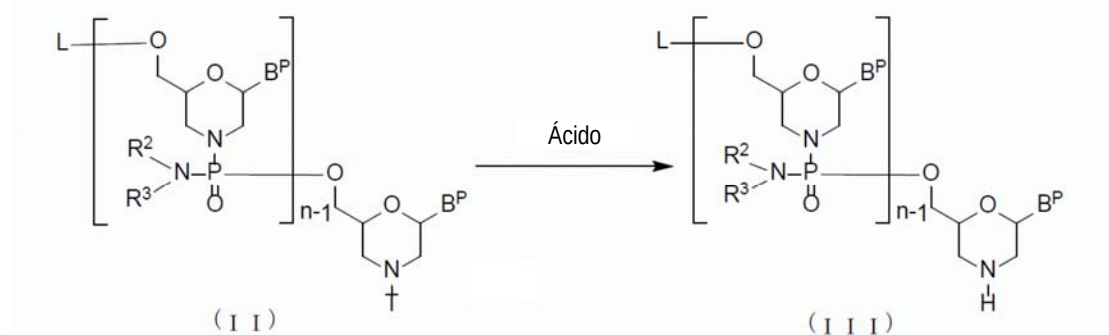
PMO (I) se puede preparar de acuerdo con procedimientos conocidos, por ejemplo, al conducir las operaciones mostradas en los siguientes pasos.

Los compuestos y reactivos utilizados en los siguientes pasos no se limitan de ninguna manera siempre y cuando se utilicen comúnmente para la preparación de PMO. Por otra parte, todos los siguientes pasos se pueden lograr por el método de fase líquida o el método de fase sólida (de acuerdo con los manuales de instrucciones o utilizando un sintetizador automático de fase sólida comercialmente disponible). Cuando PMO se prepara por el método de fase sólida, es deseable utilizar un sintetizador automático en términos de síntesis de operación y precisión simple.

[0078]

(1) Paso A:

Esto es un paso donde un compuesto representado por la siguiente fórmula general (II) (a partir de ahora referido como el compuesto (II)) se trata con un ácido para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula general (III) (a partir de ahora referido como el compuesto (III)):



[en donde n, R² y R³ son los mismos como se define en lo anterior;

cada B^P representa independientemente una nucleobase que se puede proteger;

T representa un grupo tritilo, un grupo monometoxitritilo o un grupo dimetoxitritilo; y

L representa hidrógeno, acilo o un grupo representado por la siguiente fórmula general (IV) (a partir de ahora referido como grupo (IV))]:



(I V)

[0079]

“Nucleobases” posibles para B^P se pueden ejemplificar por las mismas “nucleobases” como se lista para Base, con la condición que los grupos amino o los grupos hidroxilo en estas nucleobases para B^P se puedan proteger.

[0080]

Los grupos protectores para estos aminos no se limitan de ninguna manera siempre y cuando se utilicen como grupos protectores para los ácidos nucleicos. Más específicamente, los ejemplos incluyen benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-ter-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo, y (dimetilamino)metileno. Los grupos protectores para los grupos hidroxilo incluyen, por ejemplo, 2-cianoetilo, 4-nitrofenetilo, fenilsulfoniletilo, metilsulfoniletilo, trimetilsililetilo, fenilo que se puede sustituir con 1 a 5 grupos de extracción de electrones en cualquiera de la posición(es) sustituible, difenilcarbamoilo, dimetilcarbamoilo, dietilcarbamoilo, metilfenilcarbamoilo, 1-pirrolidinilcarbamoilo, morfolinocarbamoilo, 4-(ter-butylcarboxi)bencilo, 4-[(dimetilamino)carboxi]bencilo, y 4-(fenilcarboxi)bencilo (ver, por ejemplo, WO2009/064471).

[0081]

El “portador sólido” no se limita de ninguna manera siempre y cuando sea un portador disponible para el uso en la reacción de fase sólida de los ácidos nucleicos, pero es deseable utilizar, por ejemplo, un portador que (i) es escasamente soluble en reactivos disponibles para el uso en la síntesis de derivados de ácido nucleico de morfolino (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, N-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético), (ii) es químicamente estable contra los reactivos disponibles para el uso en la síntesis de derivados de ácido nucleico de morfolino, (iii) se puede modificar químicamente, (iv) se puede cargar con derivados de ácido nucleico de morfolino deseados, (v) tiene resistencia suficiente para soportar la alta presión durante el procesamiento, y (vi) tiene un cierto intervalo tamaño de partícula y distribución. Más específicamente, los ejemplos incluyen poliestirenos hinchables (por ejemplo, resina de

aminometil poliestireno reticulada con 1% de divinilbenceno (malla 200 a 400) (2.4 a 3.0 mmol/g) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japón), Resina de Poliestireno Aminometilada HCl [divinilbenceno al 1%, malla 100 a 200] (Peptide Institute, Inc., Japón)), poliestirenos no hinchables (por ejemplo, Primer Support (GE Healthcare)), poliestirenos ligados a cadena PEG (por ejemplo, resina NH₂-PEG (Watanabe Chemical Industries, Ltd., Japón), resina TentaGel), vidrio de poro controlado (CPG) (por ejemplo, un producto de CPG Inc.), vidrio de poro controlado oxalilado (ver, por ejemplo, Alul y colaboradores, Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), soporte derivatizado de aminopolietilenglicol con soporte de TentaGel (ver, por ejemplo, Wright y colaboradores, Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), y un copolímero de Poros-poliestireno/divinilbenceno.

[0082]

Como un “ligador,” es posible utilizar un ligador conocido que se utiliza comúnmente para ligar un ácido nucleico o un derivado de ácido nucleico de morfolino. Ejemplos adecuados incluyen 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dietanol sulfonilo, y un alquilamino de cadena larga (LCAA).

[0083]

Ejemplos de un “ácido” disponible para el uso en este paso incluye ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético o ácido tricloroacético. La cantidad de un ácido que se utiliza es, por ejemplo, en el intervalo de 0.1 equivalentes molares a 1000 equivalentes molares, tal como en el intervalo de 1 equivalente molar a 100 equivalentes molares, con respecto a 1 mol del compuesto (II).

[0084]

Por otra parte, es posible utilizar una amina orgánica junto con el ácido anterior. Cualquier amina orgánica se puede utilizar para este propósito, y ejemplos incluyen trietilamina. La cantidad de una mina orgánica que se utiliza es, por ejemplo, razonablemente en el intervalo de 0.01 equivalentes molares a 10 equivalentes molares, tal como en el intervalo de 0.1 equivalentes molares a 2 equivalentes molares, con respecto a 1 mol del ácido.

[0085]

En caso donde un ácido y una amina orgánica se utilizan como una sal o mezcla en este paso, los ejemplos incluyen una sal o mezcla de ácido trifluoroacético y trietilamina, de

manera más específica una mezcla que contiene 2 equivalentes de ácido trifluoroacético y 1 equivalente de trietilamina.

[0086]

Un ácido disponible para el uso en este paso se puede utilizar para que se diluya con un solvente apropiado para dar una concentración en el intervalo de 0.1% a 30%. Cualquier solvente se puede utilizar para este propósito siempre y cuando sea inerte a la reacción, y ejemplos incluyen diclorometano, acetonitrilo, alcoholes (por ejemplo, etanol, isopropanol, trifluoroetanol), agua, o mezclas de los mismos.

[0087]

La temperatura de reacción en la reacción anterior es, por ejemplo, en el intervalo de 10°C a 50°C, tal como en el intervalo de 20°C a 40°C o en el intervalo de 25°C a 35°C.

[0088]

El tiempo de reacción variará dependiendo del tipo de ácido que se utilice y/o la temperatura de reacción, pero es en general en el intervalo de 0.1 minutos a 24 horas, y de manera adecuada en el intervalo de 1 minuto a 5 horas.

[0089]

Por otra parte, después de la finalización de este paso, se puede agregar una base opcionalmente para neutralizar el ácido restante en el sistema. Cualquier "base" se puede utilizar para este propósito y ejemplos incluyen diisopropiletilamina. Esta base se puede utilizar al ser diluida con un solvente apropiado para dar una concentración en el intervalo de 0.1% (v/v) a 30% (v/v).

[0090]

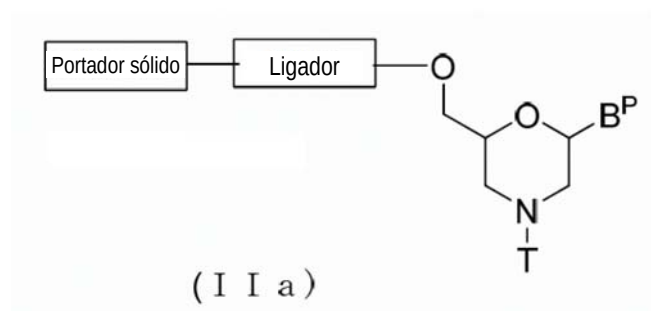
Se puede utilizar cualquier solvente en este paso siempre y cuando sea inerte la reacción, y ejemplos incluyen diclorometano, acetonitrilo, alcoholes (por ejemplo, etanol, isopropanol, trifluoroetanol), agua, o mezclas de los mismos. La temperatura de reacción es, por ejemplo, en el intervalo de 10°C a 50°C, tal como en el intervalo de 20°C a 40°C, y adecuadamente en el intervalo de 25°C a 35°C.

[0091]

El tiempo de reacción variará dependiendo del tipo de base que se utilice y/o la temperatura de reacción, pero es en general en el intervalo de 0.1 minutos a 24 horas, y de manera adecuada en el intervalo de 1 minuto a 5 horas.

[0092]

Se debe observar que el compuesto (II) en el cual $n = 1$ y L es el grupo (IV), es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIa) (a partir de ahora referido como un compuesto (IIa)) se puede preparar de acuerdo con los siguientes procedimientos:

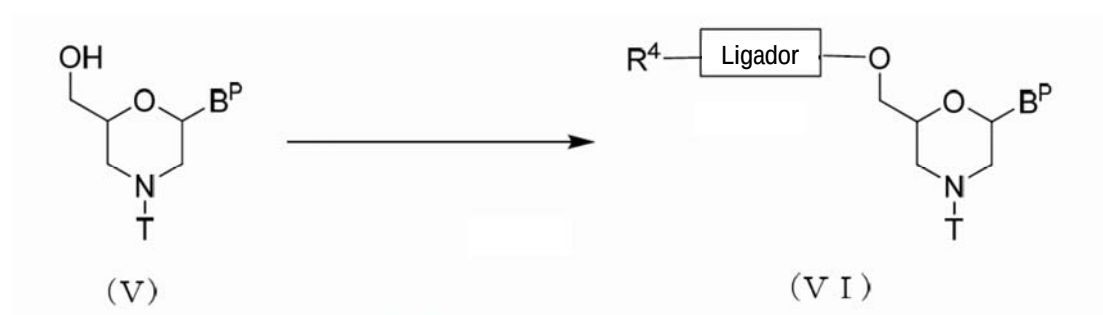


[en donde B^p, T, Ligador y Portador sólido son los mismos como se definen en lo anterior].

[0093]

Paso 1:

Este es un paso donde un compuesto representado por la siguiente fórmula general (V) se trata con un agente de acilación para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VI) (a partir de ahora referido como el compuesto (VI)):



[en donde B^p, T y Ligador son los mismos como se define en lo anterior; y

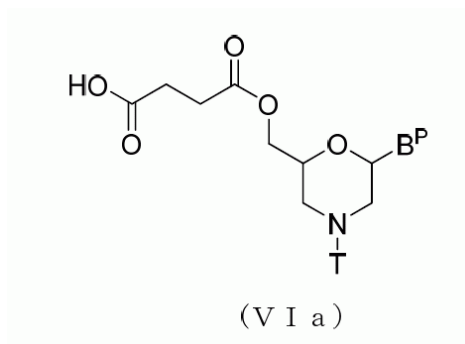
R⁴ representa un grupo hidroxilo, halógeno, un grupo carboxilo o amino].

[0094]

Este paso se puede lograr comenzando del compuesto (V) por cualquier reacción conocida para la introducción del ligador.

[0095]

En particular, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VIa) se puede preparar por cualquier proceso conocido como reacción de esterificación con el uso del compuesto (V) y anhídrido succínico:

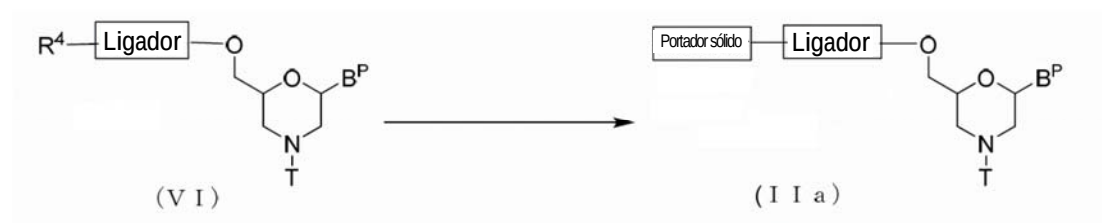


[en donde B^P y T son los mismos como se define en lo anterior].

[0096]

Paso 2:

Este es un paso donde el compuesto (VI) se hace reaccionar con un portador sólido que se trata con un agente de condensación o similar para preparar el compuesto (IIa):



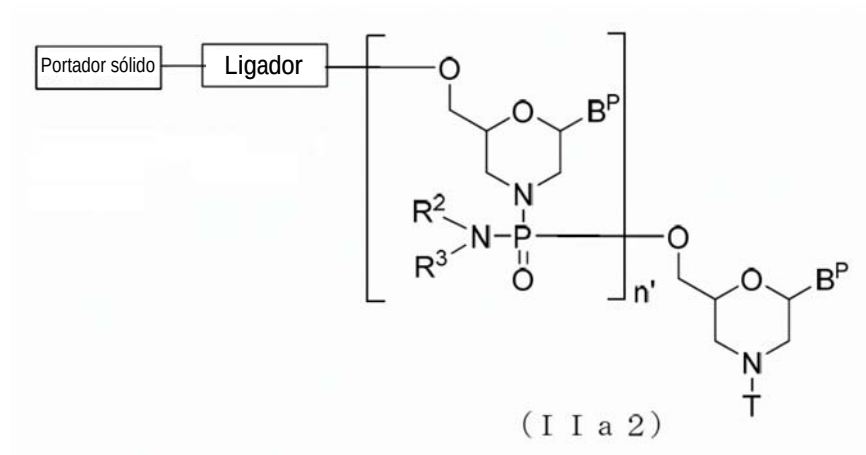
[en donde B^P, R⁴, T, Ligador y Portador sólido son los mismos como se definen en lo anterior].

[0097]

Este paso se puede lograr por cualquier proceso conocido como reacción de condensación con el uso del compuesto (VI) y un portador sólido.

[0098]

El compuesto (II) en el cual n = 2 a 99 (adecuadamente cualquier número entero en el intervalo de 13 a 29, 14 a 28, 15 a 27, 16 a 26 o 17 a 25) y L es el grupo (IV), es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIa2) se puede preparar comenzando del compuesto (IIa) al repetir los Pasos A y B las veces deseadas del proceso para la preparación de PMO descrito en la presente:



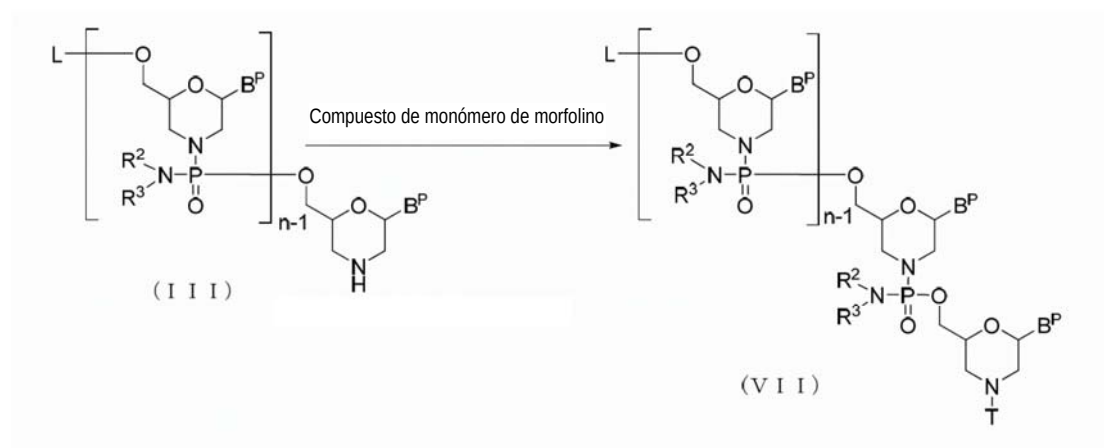
[en donde B^P , R^2 , R^3 , T, Ligador y Portador sólido son los mismos como se definen en lo anterior; y

n' representa 1 a 98 (en formas de realización particulares, n' representa 1 a 28, 1 a 27, 1 a 26, 1 a 25, o 1 a 24)].

[0099]

(2) Paso B:

Este es un paso donde el compuesto (III) se trata con un compuesto de monómero de morfolino en presencia de una base para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VII) (a partir de ahora referido como el compuesto (VII)):



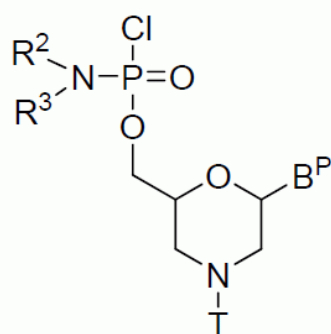
[en donde cada B^P , L, n, R^2 , R^3 y T son los mismos como se definen en lo anterior].

[00100]

Este paso se puede lograr al tratar el compuesto (III) con un compuesto de monómero de morfolino en presencia de una base.

[00101]

Tal compuesto de monómero de morfolino se puede ejemplificar por un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VIII):



(VIII)

[en donde B^P, R², R³ y T son los mismos como se definen en lo anterior].

[00102]

Ejemplos de una “base” disponible para el uso en este paso incluyen diisopropiletilamina, trietilamina o N-etilmorfolina. La cantidad de una base que se utiliza es, por ejemplo, en el intervalo de 1 equivalente molar a 1000 equivalentes molares, adecuadamente en el intervalo de 10 equivalentes molares a 100 equivalentes molares, con respecto a 1 mol del compuesto (III).

[00103]

Este compuesto de monómero de morfolino y una base disponible para el uso en este paso se puede utilizar al ser diluido con un solvente apropiado para dar una concentración de 0.1% al 30%. Cualquier solvente se puede utilizar para este propósito siempre y cuando sea inerte a la reacción, y ejemplos incluyen N,N-dimetilimidazolidinona, N-metilpiperidona, DMF, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidro-furano o mezclas de los mismos.

[00104]

La temperatura de reacción es, por ejemplo, en el intervalo de 0°C a 100°C, y adecuadamente en el intervalo de 10°C a 50°C.

[00105]

El tiempo de reacción variará dependiendo del tipo de base que se utiliza y/o la temperatura de reacción, pero es en general en el intervalo de 1 minuto a 48 horas, y adecuadamente en el intervalo de 30 minutos a 24 horas.

[00106]

Por otra parte, después de la finalización de este paso, se puede agregar opcionalmente un agente de acilación. Ejemplos de un “agente de acilación” incluyen anhídrido acético, cloruro de ácido acético y anhídrido fenoxiacético. Este agente de acilación se puede utilizar para ser diluido con un solvente apropiado para dar una concentración en el intervalo de 0.1% a 30%, a manera de ejemplo. Cualquier solvente se puede utilizar para este propósito siempre y cuando sea inerte a la reacción, y ejemplos incluyen diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, alcoholes (por ejemplo, etanol, isopropanol, trifluoroetanol), agua, o mezclas de los mismos.

[00107]

Si es necesario, es posible utilizar una base (por ejemplo, piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropiletilamina, N-etilmorfolina) junto con un agente de acilación. La cantidad de un agente de acilación que se utiliza es adecuadamente en el intervalo de 0.1 equivalentes molares a 10000 equivalentes molares, y de manera más adecuada en el intervalo de 1 equivalente molar a 1000 equivalentes molares. La cantidad de una base que se utiliza es, por ejemplo, en el intervalo de 0.1 equivalentes molares a 100 equivalentes molares, de manera adecuada en el intervalo de 1 equivalente molar a 10 equivalentes molares, con respecto a 1 mol de un agente de acilación.

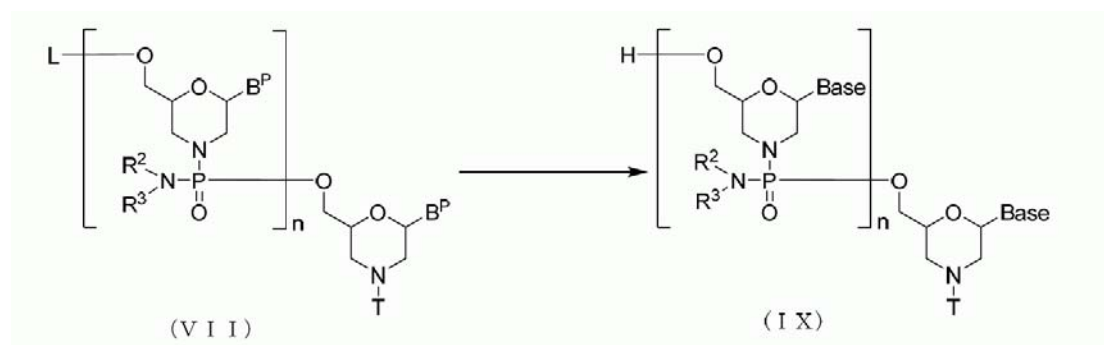
[00108]

La temperatura de reacción en esta reacción es de manera adecuada en el intervalo de 10°C a 50°C, tal como en el intervalo de 20°C a 40°C, y de manera adecuada en el intervalo de 25°C a 35°C. El tiempo de reacción variará, por ejemplo, dependiendo del tipo de agente de acilación que se utiliza y/o la temperatura de reacción, pero es en general en el intervalo de 0.1 minutos a 24 horas, y de manera adecuada en el intervalo de 1 minuto a 5 horas.

[00109]

(3) Paso C:

Este es un paso donde un agente de desprotección se utiliza para eliminar los grupos protectores del compuesto (VII) preparado en el Paso B, preparando de esta manera un compuesto representado por la fórmula general (IX):



[en donde la Base, B^P , L, n, R^2 , R^3 y T son los mismos como se definen en lo anterior].

[00110]

Este paso se puede lograr al tratar el compuesto (VII) con un agente de desprotección.

[00111]

Ejemplos de un “agente de desprotección” incluyen amoníaco acuoso concentrado y metilamina. Este “agente de desprotección” disponible para el uso en este paso se puede utilizar al ser diluido con agua, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, DMF, N,N-dimetilimidazolidinona, N-metilpiperidona o un solvente mezclado de los mismos. Entre ellos, se prefiere el etanol. La cantidad de un agente de desprotección que se utiliza es, por ejemplo, en el intervalo de 1 equivalente molar a 100000 equivalentes molares, de manera adecuada en el intervalo de 10 equivalentes molares a 1000 equivalentes molares, con respecto a 1 mol del compuesto (VII), a manera de ejemplo.

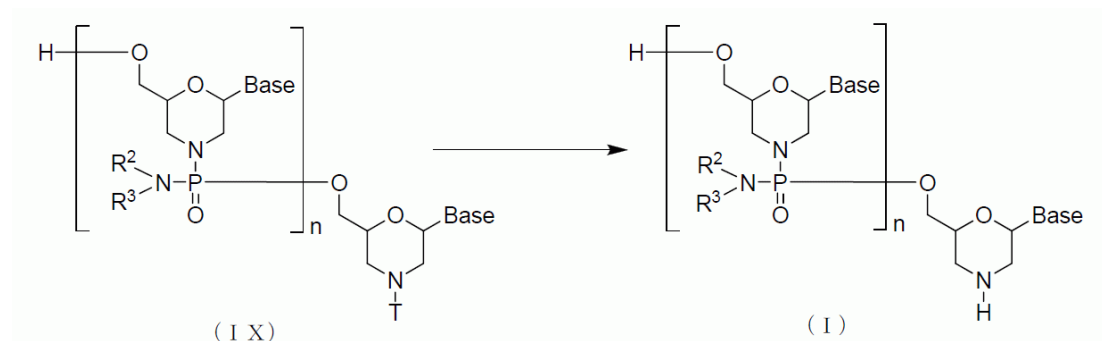
[00112]

La temperatura de reacción es, por ejemplo, en el intervalo de 15°C a 75°C, de manera adecuada en el intervalo de 40°C a 60°C o en el intervalo de 50°C a 60°C. El tiempo de reacción para la desprotección variará dependiendo del tipo de compuesto (VII) y/o la temperatura de reacción, etc., pero es razonablemente en el intervalo de 10 minutos a 30 horas, de manera adecuada en el intervalo de 30 minutos a 24 horas, y de manera más adecuada en el intervalo de 5 horas a 20 horas.

[00113]

(4) Paso D:

Este es un paso donde el compuesto (IX) preparado en el Paso C se trata con un ácido para preparar PMO (I):



[en donde la Base, n, R², R³ y T son los mismos como se definen en lo anterior].

[00114]

Este paso se puede lograr al agregar un ácido al compuesto (IX).

[00115]

Ejemplos de un “ácido” disponible para el uso en este paso incluyen ácido tricloroacético, ácido dicloroacético, ácido acético, ácido fosfórico y ácido clorhídrico, etc. Conforme a la cantidad de un ácido que se utiliza, es razonable utilizar el ácido en una cantidad para proporcionar un pH de solución, por ejemplo, en el intervalo de 0.1 a 4.0, de manera adecuada en el intervalo de 1.0 a 3.0. Se puede utilizar cualquier solvente en este paso siempre y cuando sea inerte a la reacción, y ejemplos incluyen acetonitrilo, agua o solventes mezclados de los mismos.

[00116]

La temperatura de reacción es de manera adecuada en el intervalo de 10°C a 50°C, tal como en el intervalo de 20°C a 40°C o en el intervalo de 25°C a 35°C. El tiempo de reacción para la desprotección variará dependiendo del tipo de compuesto (IX) y/o la temperatura de reacción, etc., pero es de manera adecuada en el intervalo de 0.1 minutos a 5 horas, tal como en el intervalo de 1 minuto a 1 hora, y de manera más adecuada en el intervalo de 1 minuto a 30 minutos.

[00117]

PMO (I) se puede obtener de la mezcla de reacción obtenida en este paso mediante medios de separación y purificación comúnmente utilizados incluida extracción, concentración, neutralización, filtración, centrifugación, recristalización, cromatografía de columna de fase inversa C_8 a C_{18} , cromatografía de columna de intercambio catiónico, cromatografía de columna de intercambio aniónico, cromatografía de columna de filtración en gel, cromatografía líquida de alto desempeño, diálisis, ultrafiltración y otros medios, que se pueden utilizar ya sea solos o en combinación, por lo que el PMO deseado (I) se puede aislar y purificar (ver, por ejemplo, WO1991/09033).

[00118]

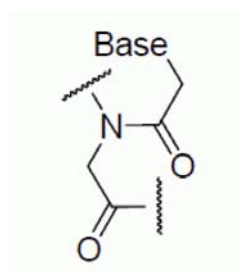
En caso de utilizar cromatografía de fase inversa para purificación de PMO (I), una solución mezclada de solución amortiguadora de trietilamina/acetato 20 mM y acetonitrilo se puede utilizar como un solvente de elución, por medio de ejemplo.

[00119]

Del mismo modo, en caso de utilizar cromatografía de intercambio iónico para purificación de PMO (I), una solución mezclada de cloruro de sodio acuoso 1 M e hidróxido de sodio acuoso 10 mM se puede utilizar, por medio de ejemplo.

[00120]

El oligómero de ácido nucleico peptídico es un oligómero antisentido de acuerdo con la presente invención, cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula general:



(en donde la Base es la misma que se define en lo anterior).

[00121]

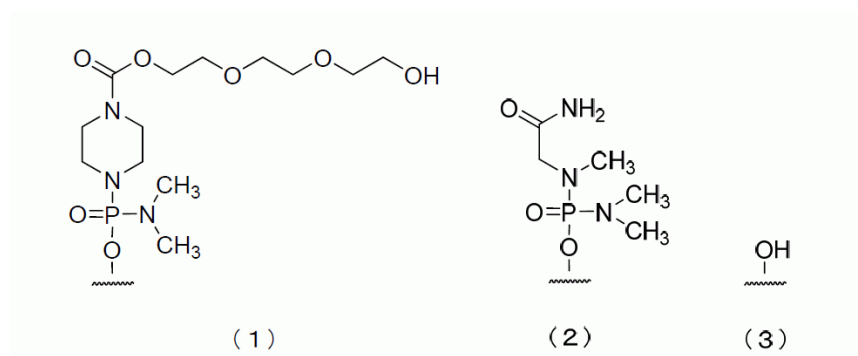
Se pueden preparar ácidos nucleicos peptídicos, por ejemplo, de acuerdo con los documentos listados a continuación.

- 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)

- 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, *Jacs.*, 114, 1895 (1992)
- 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpus, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, *J. Org. Chem.*, 59, 5767 (1994)
- 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, *J. Pept. Sci.*, 1, 175 (1995)
- 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, *J. Pept. Res.*, 49, 80 (1997)

[00122]

El oligómero antisentido de la presente invención se puede configurar tal que su extremo 5'-terminal es cualquiera de los grupos representados por las fórmulas químicas (1) a (3) mostradas a continuación, con (3)-OH que se prefiere.



Como se menciona en lo anterior, un péptido funcional (por ejemplo, CPP (péptido penetrante de células)) se puede unir al oligómero antisentido sin o a través de un ligador. Cuando el péptido funcional se une al oligómero antisentido a través de un ligador, un aminoácido adicional se puede unir al péptido funcional. En una forma de realización preferida, el péptido funcional se puede unir a un oligómero de morfolino de fosforodiamidato ("PMO") en el extremo 5'-terminal o extremo 3'-terminal con la unión al extremo 3'-terminal que se prefiere. También, en una forma de realización preferida, la C-terminal del péptido funcional se puede unir al PMO.

[00123]*Sales farmacéuticamente aceptables e hidratos*

Ejemplos de una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto (por ejemplo, oligómero antisentido) de la presente invención incluyen sales de metal alcalino (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de litio); sales de metal alcalinotérreos (por ejemplo, sal de

calcio, sal de magnesio); sales de metal (por ejemplo, sal de aluminio, sal de hierro, sal de zinc, sal de cobre, sal de níquel, sal de cobalto); sal de amonio; sales de amina orgánica (por ejemplo, sal de t-octilamina, sal de dibencilamina, sal de morfolina, sal de glucosamina, sal de éster de alquilo de fenilglicina, sal de etilendiamina, sal de N-metilglucamina, sal de guanidina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de dicitclohexilamina, sal de N,N'-dibenciletilendiamina, sal de cloroprocaína, sal de procaína, sal de dietanolamina, sal de N-bencil-fenetilamina, sal de piperazina, sal de tetrametilamonio, sal de tris(hidroximetil)aminometano); sales de hidroácido halogenadas (por ejemplo, sal de fluorhidrato, sal de clorhidrato, sal de bromhidrato, sal de yodohidrato); sales de ácidos inorgánicos (es decir, sal de nitrato, sal de perclorato, sal de sulfato, sal de fosfato); sales de ácido alcanosulfónicos inferiores (por ejemplo, sal de metanosulfonato, sal de trifluorometanosulfonato, sal de etanosulfonato); sales de ácido arilsulfónico (por ejemplo, sal de bencenosulfonato, sal de p-toluenosulfonato); sales de ácido orgánico (por ejemplo, sal de acetato, sal de malato, sal de fumarato, sal de succinato, sal de citrato, sal de tartrato, sal de oxalato, sal de maleato); sales de aminoácidos (por ejemplo, sal de glicina, sal de lisina, sal de arginina, sal de ornitina, sal de glutamato, sal de aspartato), etc. Estas sales se pueden preparar de cualquier manera conocida.

[00124]

Un hidrato del compuesto (por ejemplo, oligómero antisentido) de la presente invención se puede preparar de cualquier manera conocida.

[00125]*Formas de realización particulares*

El oligómero antisentido de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido, oligómero de morfolino o PNA que tiene una longitud de intervalo de longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención o la longitud ejemplar del oligómero antisentido de la presente invención. En una forma de realización particular, el oligonucleótido es un oligómero antisentido en donde al menos una porción de azúcar y/o al menos una porción de unión de fosfato en el oligonucleótido se modifica.

[00126]

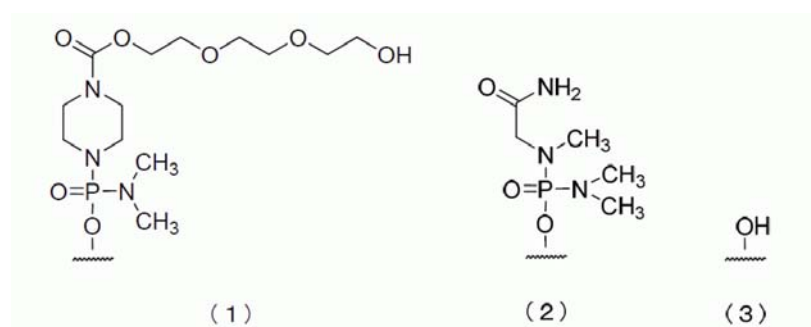
En una forma de realización particular, el oligonucleótido antisentido de la presente invención incluye al menos una porción de azúcar modificada que es una ribosa en la cual

el grupo -OH en la posición 2' se sustituye con cualquier grupo seleccionado del grupo que consiste de OR, R, R' OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br e I (en donde R representa alquilo o arilo, y R' representa alquilenos). En una forma de realización particular, el oligonucleótido incluye al menos una porción de unión de fosfato modificada seleccionada del grupo que consiste de una unión de fosforotioato, una unión de fosforoditioato, una unión de alquilfosfonato, una unión de fosforoamidato y una unión de boranofosfato.

[00127]

En una forma de realización particular, el oligonucleótido es un oligómero antisentido que comprende al menos un anillo de morfolino. En una forma de realización particular, el antisentido es un oligómero de morfolino u oligómero de morfolino de fosfordiamidato.

En una forma de realización adicional, el oligómero antisentido tiene cualquiera de los grupos representados por las fórmulas químicas (1) a (3) mostradas a continuación en su extremo 5'-terminal.



Todos los oligómeros antisentido probados en la sección de ejemplos pueden emplear cualquier modificación química como se describe en lo anterior.

Como se menciona en lo anterior, un péptido funcional (por ejemplo, CPP (péptido penetrante de células)) se puede unir al oligómero antisentido sin o a través de un ligador. Cuando el péptido funcional se une al oligómero antisentido a través de un ligador, un aminoácido adicional se puede unir al péptido funcional. En una forma de realización preferida, el péptido funcional se puede unir a un oligómero de morfolino de fosfordiamidato ("PMO") en el extremo 5'-terminal o el extremo 3'-terminal.

[00128]

Composiciones farmacéuticas

De acuerdo con el segundo aspecto de la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto de la presente invención (por ejemplo, el oligómero antisentido de la presente invención) o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de la misma como un ingrediente activo (a partir de ahora referida como “la composición farmacéutica de la presente invención”). En formas de realización particulares, la composición farmacéutica comprende cualquiera de los oligómeros u oligonucleótidos mencionados en lo anterior, o sales farmacéuticas o hidratos de los mismos, y al menos un aditivo y/o portador farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones adecuadas para el uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pa., 17^a ed., 1985. Para una breve revisión de los métodos para la administración de fármacos, ver, por ejemplo, Langer (Science 249:1527-1533, 1990).

[00129]

El portador puede servir para promover la administración del oligómero al tejido muscular. Este portador no se limita de ninguna manera siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Ejemplos adecuados incluyen portadores catiónicos (por ejemplo, liposomas catiónicos, polímeros catiónicos) o portadores basados en envoltura viral. Ejemplos de liposomas catiónicos incluyen liposomas formados de 2-O-(2-dietilaminoetil)carbamoil-1,3-O-dioleoil glicerol y un fosfolípido como miembros constituyentes esenciales (a partir de ahora referidos como “liposoma A”), Oligofectamine^{MR} (Invitrogen), Lipofectin^{MR} (Invitrogen), Lipofectamine^{MR} (Invitrogen), Lipofectamine 2000^{MR} (Invitrogen), DMRIE-C^{MR} (Invitrogen), GeneSilencer^{MR} (Gene Therapy Systems), TransMessenger^{MR} (QIAGEN), TransIT TKO^{MR} (Mirus) y Nucleofector II (Lonza). Entre ellos, se prefiere liposoma A. Ejemplos de polímeros catiónicos incluyen JetSI^{MR} (Qbiogene) y Jet-PEI^{MR} (polietilenimina, Qbiogene). Ejemplos de portadores basados en envoltura viral incluyen GenomeOne^{MR} (liposomas HVJ-E, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Japón). Alternativamente, también es posible utilizar el dispositivo farmacéutico mostrado en la Patente Japonesa No. 2924179 o los portadores catiónicos mostrados en JP WO2006/129594 y JP WO2008/096690.

[00130]

Para más detalles, se puede hacer referencia a las Patentes Estadounidenses Nos, 4,235,871 y 4,737,323, WO96/14057, “New RRC, Liposomes: A practice approach, IRL Press, Oxford (1990) páginas 33-104,” etc.

[00131]

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender opcionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable, además del oligómero antisentido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo y/o un portador como se describe en lo anterior. Ejemplos de este aditivo incluyen un auxiliar emulsionante (por ejemplo, un ácido graso que contiene 6 a 22 átomos de carbono o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, albúmina, dextrano), un agente estabilizador (por ejemplo, colesterol, ácido fosfatídico), un agente isotonizante (por ejemplo, cloruro de sodio, glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y un ajustador de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, trietanolamina). Estos aditivos se pueden utilizar ya sea solos o en combinación. El contenido del aditivo(s) en la composición farmacéutica de la presente invención es razonablemente 90% en peso o menos, tal como 60% en peso o menos, y de manera adecuada 50% en peso o menos.

[00132]

La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar al agregar el compuesto (por ejemplo, oligómero antisentido) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo a una dispersión de un portador, seguido por la agitación adecuada. El aditivo(s) se pueden agregar en una etapa apropiada, ya sea antes o después de agregar el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo. Cualquier solvente acuoso se puede utilizar para agregar el compuesto de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos incluyen agua inyectable, agua destilada inyectable, soluciones electrolíticas (por ejemplo, solución salina fisiológica) y soluciones de azúcar (por ejemplo, solución de glucosa, solución de maltosa). Por otra parte, en este caso, las condiciones que incluyen pH y temperatura se pueden seleccionar como apropiadas por aquellos expertos en la técnica.

[00133]

La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una solución o una formulación liofilizada de la misma. Esta formulación liofilizada se puede preparar en una manera estándar al secar por congelación la composición farmacéutica de la presente invención en una forma de solución. Por ejemplo, la composición farmacéutica

de la presente invención en una forma de solución se puede esterilizar como sea apropiado y luego dispensar en cantidades dadas en viales, seguido por congelación preliminar bajo condiciones de aproximadamente -40°C a -20°C durante aproximadamente 2 horas, secado primario a aproximadamente 0°C a 10°C bajo presión reducida y luego secado secundario de aproximadamente 15°C a 25°C bajo presión reducida. Por otra parte, en la mayoría de casos, los viales se pueden purgar con un gas nitrógeno y luego tapar, dando de esta manera una formulación liofilizada de la composición farmacéutica de la presente invención.

[00134]

Esta formulación liofilizada de la composición farmacéutica de la presente invención se pueden utilizar en general después de ser reconstituida mediante la adición de cualquier solución apropiada (es decir, una solución de reconstitución). Ejemplos de esta solución de reconstitución incluyen agua inyectable, solución salina fisiológica, y otras soluciones de infusión comúnmente utilizadas. El volumen de esta solución de reconstitución variará, por ejemplo, dependiendo del uso propuesto y no se limita de ninguna manera, pero es razonablemente 0.5 a 2 veces mayor que el volumen de solución antes del secado por congelación, o 500 mL o menos.

[00135]

El compuesto (por ejemplo oligómero antisentido) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo contenido en la composición farmacéutica de la presente invención puede estar en la forma de un hidrato del mismo. Este hidrato se puede preparar de cualquier manera conocida.

[00136]

Las composiciones y métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas son dependientes en un número de criterios, que incluyen, pero no se limitan a, vía de administración, grado de enfermedad o dosis que se administra.

[00137]

Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales o se pueden filtrar estériles. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para uso como se encuentran, o se liofilizan, la preparación liofilizada se combina con un portador acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones será típicamente entre 3 y 11, de manera adecuada entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y de manera más

adecuada entre 7 y 8, tal como 7 a 7.5. Las composiciones resultantes en la forma sólida se pueden envasar en múltiples unidades de dosificación individuales, que contienen cada una cantidad fija del agente o agentes mencionados en lo anterior, tal como en un envase sellado de cápsulas o comprimidos. La composición en forma sólida también se puede envasar en un recipiente por una cantidad flexible, tal como en un tubo comprimible diseñado para una crema o ungüento tópicamente aplicable.

[00138]

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar en cualquier modo farmacéuticamente aceptable, que se puede seleccionar como sea apropiado para el método terapéutico propuesto. Sin embargo, en términos de facilidad de administración al tejido muscular, se prefieren administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración oral, administración intersticial, administración percutánea, etc. Por otra parte, la composición de la presente invención puede estar en cualquier forma de dosificación, y los ejemplos incluyen varios tipos de inyecciones, formulaciones orales, gotas, inhalantes, ungüentos, lociones, etc.

[00139]

La concentración del compuesto (por ejemplo oligómero antisentido) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo contenido en la composición farmacéutica de la presente invención variará, por ejemplo, dependiendo del tipo de portador, pero es razonablemente en el intervalo de 0.1 nM a 100 μ M, y de manera adecuada en el intervalo de 100 nM a 10 μ M. Del mismo modo, la relación en peso del portador al oligómero antisentido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo contenido en la composición farmacéutica de la presente invención (es decir, el oligómero portador/antisentido o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato de la misma relación) variará, por ejemplo, dependiendo de las propiedades del oligómero y del tipo de portador, pero es razonablemente en el intervalo de 0.1 a 100, y de manera adecuada en el intervalo de 0.1 a 10.

[00140]

El compuesto de la invención, una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo se puede incluir en una formulación unitaria tal como en un portador farmacéuticamente

aceptable o diluyente en una cantidad suficiente para administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente aceptable sin provocar efectos secundarios serios en el sujeto.

[00141]

La dosis para la administración de la composición farmacéutica de la presente invención se ajusta de manera deseable en consideración del tipo del oligómero antisentido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo contenido en el mismo, la forma de dosificación propuesta, la condición de un sujeto tal como edad y peso corporal, la vía de administración, y la naturaleza y gravedad de una enfermedad. Si el sujeto es un sujeto humano, la dosis diaria para adultos es en general en el intervalo de 0.1 mg a 10 g/kg de peso corporal, tal como en el intervalo de 1 mg a 1 g/kg de peso corporal, 20 mg a 120 mg/kg de peso corporal, 30 mg a 100 mg/kg de peso corporal, o 40 mg a 80 mg/kg de peso corporal, calculado como la cantidad del oligómero antisentido de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo. Este intervalo numérico puede variar dependiendo del tipo de la enfermedad que se toma como objetivo, el modo de administración y/o el tipo de molécula objetivo. De esta manera, una dosis menor que este intervalo puede ser suficiente en algunos casos, o a la inversa, una dosis más alta que este intervalo debe ser requerido en algunos casos. Por otra parte, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar una vez a varias veces al día o en intervalos de uno a varios días.

[00142]

En otra forma de realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que comprende un vector capaz de expresar el compuesto de la presente invención (por ejemplo, el oligonucleótido antisentido de la presente invención) y un portador como se describe en lo anterior. Este vector de expresión puede ser capaz de expresar una pluralidad de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención. Esta composición farmacéutica puede comprender opcionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable, como se describe en lo anterior. La concentración del vector de expresión contenido en esta composición farmacéutica variará, por ejemplo, dependiendo del tipo de portador, pero es razonablemente en el intervalo de 0.1 nM a 100 μ M, y de manera adecuada en el intervalo de 100 nM a 10 μ M. La relación en peso del portador al vector de expresión contenido en esta composición farmacéutica (es decir, la relación de portador/vector de expresión) variará, por ejemplo, dependiendo de las propiedades del vector de expresión y del tipo de portador, pero es

razonablemente en el intervalo de 0.1 a 100, y de manera adecuada en el intervalo de 0.1 a 10. Por otra parte, el contenido del portador contenido en esta composición farmacéutica es el mismo como se describe en lo anterior, y los procedimientos para la preparación también son los mismos como se describen en lo anterior.

[00143]*Usos terapéuticos*

El compuesto de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo o la composición farmacéutica de la invención que comprende estos (a partir de ahora referidos como “Agente terapéutico de la presente invención”) se pueden utilizar en la terapia, tal como en el tratamiento de un humano.

[00144]

El agente terapéutico de la presente invención se puede proporcionar para el uso en la prevención o tratamiento de un trastorno metabólico (por ejemplo, obesidad, síndrome metabólico, diabetes), una enfermedad amiotrófica o una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica. Ejemplos de una enfermedad amiotrófica o una enfermedad de atrofia muscular incluyen amiotrofia miogénica (por ejemplo, distrofia muscular (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Fukuyama, distrofia miotónica), miopatía congénita, miositis de cuerpos de inclusión), amiotrofia neurogénica (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinal y bulbar), amiotrofia en desuso (por ejemplo, síndrome en desuso inducido por apoplejía), enfermedades de atrofia muscular (por ejemplo, caquexia cancerosa, amiotrofia relacionada con septicemia) y varios tipos de enfermedades sarcopénicas incluida pérdida muscular esquelética relacionada con la edad (sarcopenia relacionada con la edad), con distrofia muscular que es particularmente adecuada.

[00145]

En algunas formas de realización de la presente invención, se proporciona un método para la prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica o una enfermedad de atrofia muscular con una cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico de la presente invención. En una forma de realización particular, el compuesto (por ejemplo oligómero antisentido) de la presente invención o una sal farmacéuticamente

aceptable o hidrato del mismo se puede administrar al sujeto en una forma de la composición farmacéutica de la presente invención.

[00146]

En el contexto de la presente invención, el término “sujeto” se propone para referirse a un sujeto humano o un animal de sangre caliente no humano, como es ejemplificado por aves y mamíferos no humanos (por ejemplo, vaca, mono, gato, ratón, rata, conejillo de indias, hámster, cerdo, perro, conejo, oveja, caballo). El “sujeto” es de manera preferente un sujeto humano.

[00147]

En formas de realización particulares de la presente invención, se proporciona el uso del Agente terapéutico de la presente invención en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica o una enfermedad de atrofia muscular. En formas de realización particulares de la presente invención, se proporciona el uso del compuesto (por ejemplo oligómero antisentido) de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo en la preparación de una composición farmacéutica para la prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica o una enfermedad de atrofia muscular.

[00148]

En otras formas de realización de la presente invención, se proporciona el Agente terapéutico de la presente invención para el uso en el tratamiento de una enfermedad amiotrófica o una enfermedad de atrofia muscular.

[00149]

Como se describe en lo anterior, el compuesto de la presente invención permite la inhibición de la transducción de señal de miostatina en el nivel de ARNm a través, por ejemplo, de la inducción de la omisión de exones o degradación de ARNm. En una forma de realización, el compuesto de la presente invención puede ser el oligómero antisentido de la presente invención.

[00150]

La inhibición de la señal de miostatina en los tejidos musculares se puede aplicar a la prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica. La atrofia de músculo esquelético no solo

reduce la calidad de vida del sujeto sino también acompaña complicación sistémica seria incluida desnutrición e insuficiencia respiratoria y de esta manera los agentes y tratamientos capaces de abordar esta necesidad médica son requeridos.

[00151]

De esta manera, una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica se pueden prevenir o tratar cuando el agente terapéutico de la presente invención se administra a un sujeto en necesidad de prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica.

[00152]

La presente invención también proporciona el Agente terapéutico de la presente invención para el uso en la terapia en un sujeto.

Dicha terapia puede ser la prevención o tratamiento de la enfermedad listada en lo anterior.

En una forma de realización, la terapia puede ser la prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica en un sujeto. En una forma de realización, la enfermedad amiotrófica puede ser distrofia muscular de Duchenne. El sujeto puede ser un sujeto humano.

[00153]

La presente invención también proporciona el uso del compuesto de la presente invención o sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo en la fabricación de un medicamento (tal como una composición farmacéutica) para prevenir o tratar una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica en un sujeto. En una forma de realización, la enfermedad amiotrófica es distrofia muscular de Duchenne. En una forma de realización, el sujeto es un humano.

[00154]

La dosis y la vía de administración pueden ser las mismas como aquellas listadas para la composición farmacéutica de la presente invención.

[00155]

La presente invención también proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del

Agente terapéutico de la presente invención. La enfermedad puede ser un trastorno metabólico (por ejemplo, obesidad, síndrome metabólico, diabetes), una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica. Ejemplos de una enfermedad amiotrófica o una enfermedad de atrofia muscular incluyen amiotrofia miogénica (por ejemplo, distrofia muscular (por ejemplo, distrofia muscular de Duchenne, distrofia muscular de Fukuyama, distrofia miotónica), miopatía congénita, miositis de cuerpos de inclusión), amiotrofia neurogénica (por ejemplo, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, atrofia muscular espinal y bulbar), amiotrofia por desuso (por ejemplo, síndrome de desuso inducido por apoplejía), enfermedades de atrofia muscular (por ejemplo, caquexia cancerosa, amiotrofia relacionada con septicemia) y varios tipos de enfermedades sarcopénicas que incluyen pérdida de músculo esquelético relacionado con la edad (sarcopenia relacionada con la edad), con distrofia muscular que es particularmente adecuada. En una forma de realización, la terapia puede ser la prevención o tratamiento de una enfermedad amiotrófica, una enfermedad de atrofia muscular o una enfermedad sarcopénica en un sujeto.

En una forma de realización, la enfermedad amiotrófica puede ser distrofia muscular de Duchenne. El sujeto puede ser un sujeto humano. La dosis y la vía de administración pueden ser las mismas como aquellas listadas para la composición farmacéutica de la presente invención.

[00156]

Animales

La presente invención también proporciona un animal genéticamente manipulado que produce una versión truncada de la proteína ACVR2B que carece de una parte de la región intracelular de ACVR2B (a partir de ahora referido como “el animal GM de la presente invención”). Como se utiliza en la presente, los animales pueden ser de cualquier especie excepto de un humano. Los animales particularmente adecuados son animales domésticos tal como peces (por ejemplo, atún), ganado vacuno, ovejas, cabras o cerdos.

La persona de experiencia en la técnica es capaz de generar este animal genéticamente manipulado utilizando técnicas estándares. Por ejemplo, el animal GM de la presente invención se puede producir al administrar el compuesto de la presente invención o una composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, el animal GM de la

presente invención se puede producir por CRISPR-CAS9, ARNsi, sistema de inactivación loxP, TALENs, salientes de Zinc (ZFN) u oligómero antisentido.

[00157]

Cuando se utiliza CRISPR-CAS9, una ARN guía que tiene una secuencia complementaria a una secuencia objetivo del ADN genómico que codifica ACVR2B o una parte de ACVR2B (por ejemplo, la región intracelular de la ACVR2B de tipo natural) se introduce a una célula objetivo o un animal hospedero, identificando de esta manera una secuencia objetivo a ser escindida. La proteína Cas9 (o similar a Cas9) introducida a la célula objetivo escinde la parte de doble hebra compuesta del ADN genómico y el ARN guía. A través de un proceso para reparar el sitio de escisión, es provocada una mutación(es) por deficiencia e/o inserción de nucleótidos, provocando de esta manera la desactivación de la ACVR2B. Ejemplos de la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de exones, por ejemplo exones 1 a 11 de ACVR2B. De manera adecuada, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 o grupo que consiste de exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B. En una forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 9 y 10 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6, 9 y 10 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5, 6 y 10 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 5 y 6 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 7, 8 y 9 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 7 y 8 de ACVR2B. En otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 5 de ACVR2B. Todavía en otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 6 de ACVR2B. Todavía en otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 7 de ACVR2B. Todavía en otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 8 de ACVR2B. Todavía en otra forma de

realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 9 de ACVR2B. Todavía en otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 10 de ACVR2B. Todavía en otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico es el exón 11 de ACVR2B. Todavía en otra forma de realización, la secuencia objetivo del ADN genómico incluye cualquier secuencia de al menos un exón seleccionado del grupo que consiste de los exones 7, 8, 9 y 10, o grupo que consiste de los exones 5, 6, 7, 8, 9 y 10 de ACVR2B.

Alternativamente, los intrones pueden ser el objetivo de CRISPR-CAS9. Por ejemplo, los intrones 7 y 8 que se intercalan con el exón 8 se pueden escindir. Cuando los sitios escindidos están siendo reparados, el exón 8 puede estar ausente para generar el ARNm mutante deficiente de exón 8. Similarmente, los intrones 4 y 5, o intrones 5 y 6, o intrones 6 y 7, o intrones 8 y 9, o intrones 9 y 10, o intrones 10 y 11 se pueden tomar como objetivo para escisión.

[00158]

Cuando el ARNsi se utiliza para inhibir la señal de miostatina, un ARNsi diseñado para orientarse a una secuencia de ARNm de ACVR2B se introduce en una célula objetivo. Cuando la hebra guía del ARNsi de esta manera introducida se hibrida a la secuencia objetivo, entonces una proteína RISC endógena en la célula objetivo identifica la parte de doble hebra compuesta de la hebra guía y la hebra objetivo de ARNm y escinde la secuencia objetivo del ARNm. Al hacerlo de esta manera, el nivel de proteína ACVR2B en el animal GM de la presente invención se reduce.

[00159]

Cabe destacar que todas las publicaciones citadas en la presente, incluidos los documentos de la técnica anterior, gacetas de patentes y otros documentos de patente, se incorporan en la presente por referencia. La presente invención se describirá además con más detalle a continuación por medio de los siguientes ejemplos ilustrativos, aunque la presente invención no se limita a los mismos.

EJEMPLO**[00160]**

[Ejemplo de Referencia 1]

Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno

Paso 1: Preparación del ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico

Bajo una atmósfera de argón, 1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidina-2,4-diona (41.11 g) y 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) (15.58 g) se suspendieron en diclorometano (850 mL), y luego se agregó al mismo anhídrido succínico (12.76 g), seguido por agitación a temperatura ambiente durante 3.5 horas. La solución de reacción se extrajo con diclorometano y fosfato de dihidrógeno de sodio acuoso 1 M. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con fosfato de dihidrógeno de sodio acuoso 1 M y cloruro de sodio acuoso saturado. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio y se concentró bajo presión reducida. Al sólido resultante, se agregó diclorometano (600 mL) para llevar a cabo la cristalización, seguido por filtración. Después de que se agregó diclorometano adicional (300 mL), los cristales se agitaron durante 5 minutos, y luego se filtraron y se secaron durante la noche bajo presión reducida para obtener el producto deseado (50.2 g).

[00161]

Paso 2: Preparación del ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado en una resina de aminopoliestireno

Se disolvió ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-Metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico (50.2 g) en piridina (deshidratada) (600 mL), seguido por adición de 4-DMAP (12.4 g) y clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropilo)-3-etilcarbodiimida (77.6 g). La resina de aminopoliestireno resina Aminometilo (un producto de Watanabe Chemical Industries, Ltd., Japón, A00673, malla 200 a 400, 1 mmol/g, 1% de DVB) (40.5 g) y trietilamina (69.6 mL) luego se agregaron a esta mezcla, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 4 días. Después de la reacción, la resina se recolectó por filtración. La resina resultante se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano, y luego se secó bajo presión reducida. A la resina resultante, se agregaron tetrahidrofurano (deshidratado) (500 mL), anhídrido acético (104 mL) y 2,6-lutidina (128 mL), seguido por agitación a temperatura ambiente durante 4 horas. La resina se recolectó por filtración, se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano, y luego se secó bajo presión reducida para obtener 59.0 g del producto deseado.

[00162]

Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina se midió en una manera conocida como absorbancia UV a 409 nm. La cantidad de carga en la resina se encontró que es 467.83 $\mu\text{mol/g}$.

Condiciones para la medición UV

Instrumento: U-2910 (Hitachi, Ltd., Japón)

Solvente: ácido metanosulfónico

Longitud de onda: 409 nm

Valor ϵ : 45000

[00163]

[Ejemplo de Referencia 2]

Ácido 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno

Los mismos procedimientos como se muestran en el Ejemplo de Referencia 1 se repitieron para preparar el compuesto del título, excepto que 1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidina-2,4-diona utilizada en el Paso 1 del Ejemplo de Referencia 1 se reemplazó en este paso con N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida.

[00164]

Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina se midió de una manera conocida como absorbancia UV a 409 nm. La cantidad de carga en la resina se encontró que es 460.28 $\mu\text{mol/g}$.

[00165]

[Ejemplo de Referencia 3]

Ácido 4-{[(2S,6R)-6-(6-benzamidopurin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico cargado en resina de amino-poliestireno

Los mismos procedimientos como se muestran en el Ejemplo de Referencia 1 se repitieron para preparar el compuesto del título, excepto que se reemplazó 1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidina-2,4-diona utilizada en el Paso 1 del

Ejemplo de Referencia 1 en este paso con N-{9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]purin-6-il}benzamida.

[00166]

Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina se midió en una manera conocida como absorbancia UV a 409 nm. La cantidad de carga en la resina se encontró que es 425.13 $\mu\text{mol/g}$.

[00167]

[Ejemplo de Referencia 4]

Ácido 4-{{(2S,6R)-6-{6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)-amino]purin-9-il}-4-tritilmorfolin-2-il}metoxi}-4-oxo-butanoico cargado en resina de aminopoliestireno

Los mismos procedimientos como se muestran en el Ejemplo de Referencia 1 se repitieron para preparar el compuesto del título, excepto que se reemplazó la 1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidina-2,4-diona utilizada en el Paso 1 del Ejemplo de Referencia 1 en este paso con N-{6-(2-cianoetoxi)-9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]purin-2-il}-2-fenoxi-acetamida.

[00168]

Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina se midió en una manera conocida como absorbancia UV a 409 nm. La cantidad de carga en la resina se encontró que es 341.09 $\mu\text{mol/g}$.

[00169]

De acuerdo con las descripciones en el Ejemplo 1 mostradas a continuación o de acuerdo con los procedimientos descritos en PCT/JP2015/57180 utilizando un sintetizador de ácido nucleico (AKTA Oligopilot 10 plus), PMOs se sintetizaron (el extremo 5'-terminal es el grupo (3)). Entre los PMOs sintetizados, aquellos que muestran actividad de omisión se listaron en la Tabla 1.

[00170]

[Tabla 1]

No. de PMO	Nombre de la secuencia	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	Peso molecular (calculado)	Peso molecular (medido)	SEQ ID NO:
1	ACVR2B_H5_48-71	CGAGCCTTGATCTCCAGCAGCTGC	7884.72	7884.73	12
2	ACVR2B_H5_51-74	CCCCGAGCCTTGATCTCCAGCAGC	7829.72	7829.16	13
3	ACVR2B_H5_86-109	TCATGAGCTGGGCCTTCCAGACAC	7908.75	7908.84	14
4	ACVR2B_H5_119-142	GGAGTGGGAAGATCTTGACAGCTA	8076.80	8077.00	15
5	ACVR2B_H5_121-144	CTGGAGTGGGAAGATCTTGACAGC	8052.79	8052.66	16
6	ACVR2B_H5_123-146	ACCTGGAGTGGGAAGATCTTGACA	8036.79	8036.89	17
7	ACVR2B_H6_126-149	CTCACCTTGTCATGGAAGGCCGTG	7939.74	7940.09	18
8	ACVR2B_H7_10-33	GATGTTCCCCTTGAGGTAATCCGT	7929.74	7929.60	19
9	ACVR2B_H7_28-51	CAGTTCGTTCCATGTGATGATGTT	7959.74	7959.31	20
10	ACVR2B_H7_38-61	CTACATGACACAGTTCGTTCCATG	7882.73	7882.07	21
11	ACVR2B_H7_66-89	TATGAGAGGCCTCGTGACATCGTC	7963.76	7964.32	22
12	ACVR2B_H7_76-99	CTCATGCAGGTATGAGAGGCCTCG	7988.77	7988.06	23
13	ACVR2B_H7_86-109	AGGGCACATCCTCATGCAGGTATG	7972.77	7972.02	24
14	ACVR2B_H8_19-42	GTGAGGTCGCTCTTCAGCAATACA	7947.75	7947.21	25

WO 2020/138509

PCT/JP2019/051651

15	ACVR2B_H8_21-44	CTGTGAGGTCGCTCTTCAGCAATA	7938.74	7938.21	26
16	ACVR2B_H8_26-49	CACGGCTGTGAGGTCGCTCTTCAG	7955.74	7955.23	27
17	ACVR2B_H8_45-68	CCAAGCCAAAGTCAGCCAGCACGG	7920.77	7920.76	28
18	ACVR2B_H8_73-96	GGAGGTTTCCCTGGCTCAAATCGA	7963.76	7963.38	29
19	ACVR2B_H8_78-101	CCCCTGGAGGTTTCCCTGGCTCAA	7875.73	7875.76	30
20	ACVR2B_H8_87-110	CGTGGGTGTCCCCTGGAGGTTTCC	7962.74	7962.81	31
21	ACVR2B_H8_93-116	CCTGTCCGTGGGTGTCCCCTGGAG	7947.73	7947.60	32
22	ACVR2B_H9_56-79	CAATGCGCAGGAAGGCATCTCTCT	7932.76	7933.08	33
23	ACVR2B_H9_66-89	GCATACATGTCAATGCGCAGGAAG	8005.79	8005.48	34
24	ACVR2B_H10_-1-23	CAGCATGTACTCATCCACGGGTCC	7868.74	7868.93	35
25	ACVR2B_H10_49-72	CCTGCAGCTCCTCCAACGAAGGGT	7893.75	7893.29	36
26	ACVR2B_H6_16-39	GCTGAAGATCTCCCGTTCACTCTG	7874.73	7874.32	43
27	ACVR2B_H6_46-69	TAGCAGGTTCTCGTGCTTCATGCC	7905.72	7906.34	44
28	ACVR2B_H7_96-119	CCACGGCACCAGGGCACATCCTCA	7847.75	7848.04	45
29	ACVR2B_H8_34-57	TCAGCCAGCACGGCTGTGAGGTCG	7989.76	7989.50	46
30	ACVR2B_H8_38-61	AAAGTCAGCCAGCACGGCTGTGAG	8006.78	8007.05	47
31	ACVR2B_H8_30-53	CCAGCACGGCTGTGAGGTCGCTCT	7940.74	7940.81	48
32	ACVR2B_H8_69-92	GTTTCCCTGGCTCAAATCGAACAG	7907.74	7907.61	49
33	ACVR2B_H8_12-35	CGCTCTTCAGCAATACATTCTTAC	7817.71	7817.90	50

34	ACVR2B_H8_16-39	AGGTCGCTCTTCAGCAATACATTC	7882.73	7882.72	51
35	ACVR2B_H8_42-65	AGCCAAAGTCAGCCAGCACGGCTG	7951.77	7951.66	52
36	ACVR2B_H8_24-47	CGGCTGTGAGGTCGCTCTTCAGCA	7955.74	7955.10	53
37	ACVR2B_H8_46-69	GCCAAGCCAAAGTCAGCCAGCACG	7920.77	7920.54	54
38	ACVR2B_H8_53-76	TCGAACAGCCAAGCCAAAGTCAGC	7919.77	7919.50	55
39	ACVR2B_H8_82-105	GTGTCCCCTGGAGGTTTCCCTGGC	7922.72	7922.98	56
40	ACVR2B_H8_45-67	CAAGCCAAAGTCAGCCAGCACGG	7605.66	7605.47	57
41	ACVR2B_H8_97-120	GTTACCTGTCCGTGGGTGTCCCCT	7897.71	7897.41	58
42	ACVR2B_H8_61-84	GGCTCAAATCGAACAGCCAAGCCA	7919.77	7919.58	59
43	ACVR2B_H8_89-112	TCCGTGGGTGTCCCCTGGAGGTTT	7977.73	7977.47	60
44	ACVR2B_H8_15-38	GGTCGCTCTTCAGCAATACATTCT	7873.72	7873.52	61
45	ACVR2B_H8_-5-19	ATTCTTACTTTTAAAGTCCCTGTG	7878.72	7878.48	62
46	ACVR2B_H8_-2-22	TACATTCTTACTTTTAAAGTCCCT	7822.70	7822.60	63
47	ACVR2B_H8_18-41	TGAGGTCGCTCTTCAGCAATACAT	7922.74	7922.70	64
48	ACVR2B_H8_14-37	GTCGCTCTTCAGCAATACATTCTT	7848.71	7848.54	65
49	ACVR2B_H8_22-45	GCTGTGAGGTCGCTCTTCAGCAAT	7954.74	7954.19	66
50	ACVR2B_H8_23-46	GGCTGTGAGGTCGCTCTTCAGCAA	7979.75	7979.16	67
51	ACVR2B_H8_13-36	TCGCTCTTCAGCAATACATTCTTA	7832.71	7832.30	68

52	ACVR2B_H8_20-43	TGTGAGGTCGCTCTTCAGCAATAC	7938.74	7938.70	69
53	ACVR2B_H8_17-40	GAGGTCGCTCTTCAGCAATACATT	7922.74	7922.78	70

[00171]**[Ejemplo 1]**

Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 1) o ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritil-morfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 2) o ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(6-benzamidopurin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]-metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de amino-poliestireno (Ejemplo de Referencia 3) o ácido 4-[[[(2S,6R)-6-{6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il}metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 4), cada uno que corresponde a la base 5'-terminal, se llenó en una cantidad de 0.1 g en un recipiente de reacción equipado con un filtro para iniciar los siguientes ciclos de síntesis utilizando un sintetizador de péptidos (FOCUS). Para dar la secuencia de nucleótidos de cada compuesto indicado en la Tabla 1, se agregó un compuesto de monómero de morfolino deseado en cada ciclo de acoplamiento (ver la siguiente Tabla 2).

[00172]**[Tabla 2]**

Paso	Reactivo	Volumen	Tiempo	Número de corridas
1	Solución de desbloqueo	1.8 a 3	0.1 a 2	3 a 8
2	Solución neutralizante	2 a 10	1	3
3	Diclorometano	2 a 10	-	5
4	Solución de activador	1.8 a 3	-	1
5	Solución de monómero	1 a 1.5	-	1
6	Solución de activador	0.9 a 1.4	-	1
7	Reacción de acoplamiento con los reactivos cargados en Pasos 5 y 6		120 a 180	
8	Diclorometano	2 a 10	-	5
9	Solución de terminación	2 a 3	2	2

10	Diclorometano	2 a 10	-	5
----	---------------	--------	---	---

[00173]

Cabe destacar que la solución de desbloqueo utilizada se preparó al disolver una mezcla de ácido trifluoroacético (2 equivalentes) y trietilamina (1 equivalente) en una concentración de 3% (p/v) en una solución de diclorometano que contiene 1% (v/v) de etanol y 10% (v/v) de 2,2,2-trifluoroetanol. La solución de neutralización utilizada se preparó al disolver N,N-diisopropiloetilamina en una concentración de 5% (v/v) en una solución de diclorometano que contiene 25% (v/v) de 2-propanol. La solución activadora utilizada fue una solución de 1,3-dimetil-2-imidazolidinona que contiene 20% (v/v) de N,N-diisopropiloetilamina. La solución de monómero utilizada se preparó al disolver un compuesto de monómero de morfolino en una concentración de 0.20 M en tetrahidrofurano. La solución de terminación utilizada se preparó al disolver anhídrido acético a 10% (v/v) y 2,6-lutidina a 15% (v/v) en diclorometano.

[00174]

La resina de aminopoliestireno cargada con PMO sintetizada como en lo anterior se recolectó del recipiente de reacción y se secó a 30°C durante 2 horas o más tiempo bajo presión reducida. El PMO seco cargado en la resina de aminopoliestireno que se cargó en un recipiente de reacción y 5 mL de 28% de amoniaco-etanol acuoso (1/3) se agregó al mismo, seguido por reposo a 55°C durante 16 horas. La resina de aminopoliestireno se separó por filtración y se lavó con 3 mL de agua-acetonitrilo (1/1). Después de que el material filtrante resultante se mezcló con etanol (3 mL) y éter dietílico (35 mL), la mezcla se centrifugó y luego se decantó para eliminar el sobrenadante, y el residuo se secó bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 10 mL de un solvente mezclado que contiene acetato de amonio acuoso 20 mM y acetonitrilo (4/1), y luego se purificó por HPLC de fase inversa. Las condiciones utilizadas son como se indican en la siguiente Tabla 3.

[00175]

[Tabla 3]

Columna	5 μ m C18 XBridge (Waters, ϕ 19 $\times$ 50 mm, 1 CV = 14 mL)
Velocidad de flujo	10 mL/minuto
Temperatura de la	Temperatura ambiente

columna	
Solución A	Acetato de amonio acuoso 20 Mm
Solución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 20% → 50%/10 CV

CV: volumen de columna

[00176]

Las fracciones se analizaron cada una para recolectar el producto deseado. La solución resultante se mezcló con ácido clorhídrico acuoso 0.1 M (4 mL) y se dejó reposar durante 2 horas. Después de la reacción, se agregó hidróxido de sodio acuoso 1 M (0.4 mL) para neutralizar la mezcla, que luego se filtró a través de un filtro de membrana (0.22 µm).

[00177]

La solución acuosa resultante que contiene el producto deseado, se hizo alcalino con hidróxido de sodio acuoso 1 M (0.4 mL) y se purificó a través de una columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones utilizadas son como se indican en la siguiente Tabla 4.

[00178]

[Tabla 4]

Columna	Fuente 15Q (GE Healthcare, φ16 × 97 mm, 1 CV = 19.5 mL)
Velocidad de flujo	10 mL/minuto
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
Solución A	Hidróxido de sodio acuoso 10 mM
Solución B	Hidróxido de sodio acuoso 10 mM, Cloruro de sodio acuoso 1 M
Gradiente	(B) conc. 5% → 50%/20 CV

[00179]

Las fracciones se analizaron cada una (por HPLC) para obtener el producto deseado como una solución acuosa. La solución acuosa resultante se neutralizó con solución amortiguadora de fosfato 0.1 M (pH 6.0) y luego se desaló por HPLC de fase inversa bajo las condiciones mostradas en la siguiente Tabla 5.

[00180]

[Tabla 5]

Columna	YMC GEL C4 HG 10 μm (YMC, $\phi 10 \times 35$ mm, 1 CV = 2.7 mL)
Velocidad de flujo	10 mL/minuto
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
Solución A	Agua
Solución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 0% $\rightarrow$ 50%/10 CV

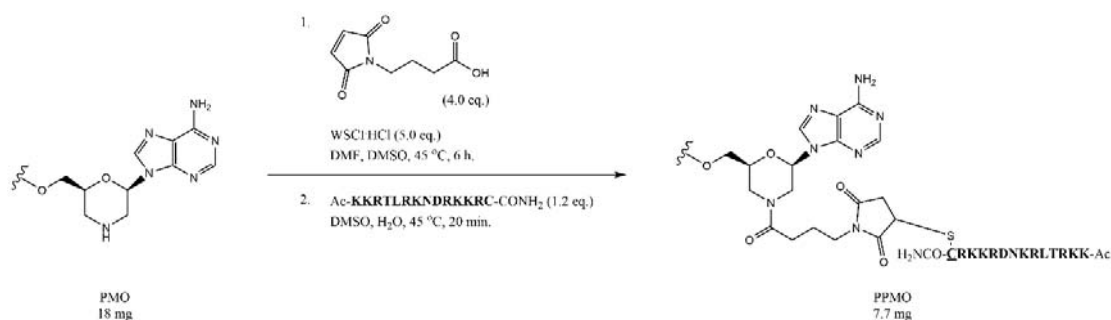
[00181]

El producto deseado se recolectó y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en agua y se secó por congelación para obtener el compuesto deseado como un sólido floculante blanco. Los valores calculados y medidos de ESI-TOF-MS se muestran en la Tabla 1.

[00182]

[Ejemplo 2]

Síntesis del conjugado de oligómero-péptido antisentido (conjugado de PMO)



El PMO (PMO No. 15, 18.1 mg, 1.0 eq.) se disolvió en DMSO (284.0 μ L) y DMF (17.5 μ L). A la solución se agregó una mezcla de ácido 4-maleimidobutírico (1.7 mg, 4.0 eq.) y WSCI·HCl (2.2 mg, 5.0 eq.) en DMSO (23.2 μ L) y DMF (22.2 μ L). La mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 6 horas. Después de que la reacción había alcanzado casi la terminación, se agregó CH₂Cl₂ (13.2 mL) a la mezcla para dar un precipitado. El precipitado se recolectó por centrifugación, seguido por secado en un vacío. El precipitado seco se volvió a disolver en DMSO (175.0 μ L) y H₂O (52.7 μ L). A la solución resultante se agregó hLIMK (Ac-KKRTLRLKNDKKRC-CONH₂, 5.1 mg, 1.2 eq.) (SEQ ID NO: 112) y la mezcla se agitó a 45°C durante 30 min. Después de la confirmación de la finalización de la reacción por el análisis HPLC, la reacción se terminó por la adición de solución de acetonitrilo (10% en H₂O; 400 μ L). La solución se diluyó con agua (aproximadamente 40 mL) y el producto deseado se purificó por cromatografía de intercambio catiónico. Las condiciones utilizadas se muestran en la siguiente Tabla 6.

[00183]

Tabla 6

Columna	Fuente 15S (GE Healthcare, ϕ 16 $\times$ 50 mm, 1 CV = 10 mL)
Velocidad de flujo	10 mL/min
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
Solución A	KH ₂ PO ₄ 25 mM con 25% de MeCN (pH 3.5)
Solución B	KH ₂ PO ₄ 25 mM con 25% de MeCN (pH 3.5) y KCl 1.5 M
Gradiente	(B) conc. 0% $\rightarrow$ 90%/30 CV

CV: Volumen de la columna

[00184]

Las fracciones se analizaron por HPLC y se recolectaron las fracciones apropiadas. La solución acuosa se diluyó siete veces con agua y luego se desaló por HPLC de fase inversa bajo las condiciones mostradas en la siguiente Tabla 7.

[00185]

Tabla 7

Columna	AMBERCHROM_CG300m_10 mm × 30 mm (1 CV = 2.4 mL)
Velocidad de flujo	5 mL/min
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
Solución A	Agua
Solución B	MeOH
Gradiente	(B) conc. 0% → 90%/30 CV

[00186]

El producto deseado se recolectó y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se disolvió en agua y se secó por congelación para proporcionar el compuesto (designado como PPMO No. 1) como un sólido floculante (7.7 mg, 34.0% de rendimiento).

[00187]

El peso molecular del compuesto obtenido (PPMO No. 1) se determinó al utilizar ESI-TOF-MS (calculado: 9973.92, observado: 9973.54).

[00188]

[Ejemplo 3]

Evaluación de la actividad de omisión de los oligómeros antisentidoTransfección de PMO en las células

En 3×10^5 células RD (línea de células de rabdomiosarcoma humano), los oligómeros antisentido mostrados en la Tabla 1 cada uno se transfectaron a 10 o 30 μM utilizando Nucleofector II (Lonza) y un Kit de Nucleofector de Línea de Células Amaxa. El programa de pulso utilizado fue T-030.

Después de la transfección, las células se cultivaron en pocillos de placas de 6 pocillos bajo CO_2 al 5% en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (Sigma-Aldrich) que contienen 10% de suero bovino fetal (FBS) (Sigma-Aldrich). Tres días después de la transfección, el medio de cultivo se reemplazó con DMEM sin suero que contiene 0.4 ng/mL de miostatina recombinante (R&D Systems) y las células se cultivaron por otras 2 horas a 37°C bajo CO_2 al 5%.

[00189]Transfección de oligonucleótidos de fosforotioato (PS) en las células

El día antes de la transfección, las células RD se sembraron en placas de 24 pocillos en una densidad de 3×10^4 células/pocillo y se cultivaron bajo CO₂ al 5% en DMEM (Sigma-Aldrich) que contiene 10% de FBS (Sigma-Aldrich). Al siguiente día, los oligómeros antisentido de oligonucleótidos de fosforotioato 2'-O-metilo (PS) (JbioS) se muestra en la Tabla 8 se transfectaron cada uno a 10 o 30 nM utilizando el Reactivo de Transfección Lipofectamina 3000 (Thermo Scientific). Las células se cultivaron durante tres días después de la transfección.

[Tabla 8]

No. de PS	Nombre de la secuencia	Secuencia de nucleótidos (5' a 3')	Peso molecular (calculado)	Peso molecular (medido)	SEQ ID NO:
1	ACVR2B_054	CAGCUGCAGUGGCUUCAGGCCAC	8347	8352.5791	71
2	ACVR2B_055	UGAUCUCCAGCAGCUGCAGUGGCU	8349	8355.2591	72
3	ACVR2B_056	CCCCGAGCCUUGAUCUCCAGCAGC	8267	8270.6786	73
4	ACVR2B_060	GUCAUUCAUGAGCUGGGCCUCCA	8310	8314.0250	74
5	ACVR2B_061	CAGCUACAAAGUCAUUCAUGAGCU	8325	8327.7387	75
6	ACVR2B_062	AAGAUCUUGACAGCUACAAAGUCA	8372	8376.2644	76
7	ACVR2B_063	CUGGAGUGGGAAGAUCUUGACAGC	8476	8480.5301	77
8	ACVR2B_006	AACUGUAGCAGGUUCUCGUGCUUC	8311	8313.9651	78
9	ACVR2B_014	CUUGAGGUAAUCCGUGAGGGAGCC	8452	8455.6050	79
10	ACVR2B_015	GAUGUCCCCCUUGAGGUAAUCCGU	8311	8317.1643	80
11	ACVR2B_016	CCAUGUGAUGAUGUCCCCUUGAG	8311	8313.8275	81
12	ACVR2B_017	CAGUUCGUUCCAUGUGAUGAUGUU	8313	8315.9555	82
13	ACVR2B_018	UACAUGACACAGUUCGUUCCAUGU	8279	8281.5703	83
14	ACVR2B_019	CGUCUCUGCUACAUGACACAGUUC	8254	8258.0108	84
15	ACVR2B_020	CUCGUGACAUCGUCUCUGCUACAU	8231	8235.1182	85

WO 2020/138509

PCT/JP2019/051651

16	ACVR2B_021	UAUGAGAGGCCUCGUGACAUCGUC	8373	8375.2037	86
17	ACVR2B_022	CUCAUGCAGGUAUGAGAGGCCUCG	8412	8416.8200	87
18	ACVR2B_023	AGGGCACAUCCUCAUGCAGGUAUG	8396	8399.2399	88
19	ACVR2B_024	CCACGGCACCAGGGCACAUCCUCA	8313	8318.7891	89
20	ACVR2B_030	GUGAGGUCGCUCUUCAGCAAUACA	8357	8361.8757	90
21	ACVR2B_031	AGCACGGCUGUGAGGUCGCUCUUC	8365	8369.4975	91
22	ACVR2B_032	AAGUCAGCCAGCACGGCUGUGAGG	8474	8475.5442	92
23	ACVR2B_033	GCCAAGCCAAAGUCAGCCAGCACG	8400	8402.1792	93
24	ACVR2B_034	AAUCGAACAGCCAAGCCAAAGUCA	8393	8397.0875	94
25	ACVR2B_035	CCUGGCUCAAAUCGAACAGCCAAG	8362	8366.7717	95
26	ACVR2B_036	GGAGGUUUUCCUGGCUCAAAUCGA	8373	8375.6335	96
27	ACVR2B_037	GUGUCCCCUGGAGGUUUUCCUGGC	8318	8322.6302	97
28	ACVR2B_038	CUGUCCGUGGGUGUCCCCUGGAGG	8397	8399.1436	98
29	ACVR2B_064	AGCCAUGUACCGUCUCGUGCCUAC	8269	8273.6442	99
30	ACVR2B_065	CACCUCAGGAGCCAUGUACCGUCU	8292	8297.9971	100
31	ACVR2B_068	UCUCUGGAAGUUGAUGGCUCCCUC	8287	8287.8070	101
32	ACVR2B_069	GAAGGCAUCUCUCUGGAAGUUGAU	8398	8400.5961	102
33	ACVR2B_070	CAAUGCGCAGGAAGGCAUCUCUCU	8356	8360.2476	103

34	ACVR2B_071	GCAUACAUGUCA AUGCGCAGGAAG	8443	8447.4672	104
35	ACVR2B_073	CCCACAGCACCAACCCCAUGGCAU	8257	8262.1851	105
36	ACVR2B_074	GACACAAGCUCCCACAGCACCAAC	8304	8308.9227	106
37	ACVR2B_075	CUUGCAGCGAGACACAAGCUCCCA	8338	8342.7494	107
38	ACVR2B_076	CGUCUGCAGCCUUGCAGCGAGACA	8371	8376.4996	108
39	ACVR2B_039	GCAGCAUGUACUCAUCCACGGGUC	8332	8336.2184	109
40	ACVR2B_043	UCCAACGAAGGGUGCUGGCCAAUC	8395	8401.4766	110
41	ACVR2B_044	CUGCAGCUCCUCCAACGAAGGGUG	8371	8377.0700	111

WO 2020/138509

PCT/JP2019/051651

[00190]**Administración gimnótica de un conjugado de PMO-péptido en las células**

El día antes de la transfección, las células RD se sembraron en placas de 24 pocillos en una densidad de 4×10^4 células/pocillo y se cultivaron bajo CO₂ al 5% en DMEM (Sigma-Aldrich) que contiene 10% de FBS (Sigma-Aldrich). Al siguiente día, el conjugado de oligómero-péptido antisentido (conjugado de PMO-péptido) sintetizado en el Ejemplo 2 se agregó al medio. Las células se cultivaron durante tres días después de la adición del conjugado de PMO-péptido.

[00191]**Extracción de ARN**

Las células se lavaron una vez con PBS (Nissui Pharmaceutical), luego 350 µL de Solución amortiguadora RLT (Qiagen) que contiene 1% de 2-mercaptoetanol (Nacalai Tesque) se agregaron a las células, y las células se lisaron al dejarlas reposar a temperatura ambiente durante cinco minutos. El lisado celular se recolectó en un homogeneizador QIAshredder (Qiagen) y se centrifugó a $20,400 \times g$ durante 2 minutos para preparar un homogenado. El ARN total se extrajo de acuerdo con la instrucción del fabricante de un Mini Kit RNeasy (Qiagen). La concentración del ARN total extraído se midió con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

[00192]**Medición de la eficiencia de omisión**

El ARN total extraído (150 ng) se utilizó como una plantilla para llevar a cabo la RT-PCR de un paso con un Kit QIAGEN OnePaso RT-PCR (Qiagen). Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo unido al kit. El Ciclador Térmico Utilizado fue TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio). El programa RT-PCR utilizado es como se muestra a continuación.

50°C durante 30 min: reacción de transcripción inversa

95°C durante 15 min: activación de polimerasa, inactivación de la transcriptasa inversa

[94°C durante 30 seg; 62°C durante 30 seg; 72°C durante 50 seg] $\times$ 32 ciclos: PCR

72°C durante 7 min: reacción de alargamiento final

[00193]

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores directos e inversos utilizados para RT-PCR son como se muestran a continuación.

Para la detección de la omisión del exón 5:

Cebador delantero: 5'-TGCTACGATAGGCAGGAGTG-3' (SEQ ID NO:37)

Cebador inverso: 5'-AGCAGGTTCTCGTGCTTCAT-3' (SEQ ID NO:38)

Para la detección de la omisión del exón 6, 7, u 8:

Cebador delantero: 5'-CATGTGGACATCCATGAGGA-3' (SEQ ID NO:39)

Cebador inverso: 5'-GAGACACAAGCTCCCACAGC-3' (SEQ ID NO:40)

Para la detección de la omisión del exón 9 o 10:

Cebador delantero: 5'-TCTATTGCCCACAGGGACTT-3' (SEQ ID NO:41)

Cebador inverso: 5'-GAGCCTCTGCATCATGGTC-3' (SEQ ID NO:42)

[00194]

La solución de reacción PCR anterior (1 µL) se analizó utilizando un Bioanalyzer (Agilent). Se midieron la molaridad del polinucleótido "A" del amplicón de PCR con la omisión del exón, es decir ACVR2B ADNc truncado, y la molaridad del polinucleótido "B" del amplicón de PCR de tipo natural, es decir ACVR2B ADNc de tipo natural. Basado en estos valores medidos de "A" y "B", se determinó la eficiencia de omisión de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$\text{Eficiencia de omisión (\%)} = A/(A + B) \times 100$$

Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 1a–1d.

Las Figuras 1a–1d indicaron que el oligómero antisentido y el conjugado de oligómero-peptido antisentido de la presente invención provocaron la omisión del exón.

[00195]

[Ejemplo 4]

Medición de la actividad negativa dominante

Se sembraron 8×10^3 células HEK-293 (línea de células de riñón embrionarias humanas) en placas blancas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific) y se cultivaron a 37°C bajo CO₂ al 5% en Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich) que contiene 10% de FBS. Al siguiente día, 10 ng de pBApo-CMV (Takara Bio) que aloja ADN que codifica

cada producto de omisión de exones (exón 5, 6, 7, 8, 9 o 10) (Eurofins Genomics) y 14 ng de ADN informador de luciferasa (Signal SMAD Reporter Assay Kit, Qiagen) se co-transfectaron en células utilizando Lipofectamine LTX (Thermo Fisher Scientific). Dos días después de la transfección, la miostatina recombinante (R&D Systems) diluida en Minimum Essential Medium Eagle sin suero se agregó al medio en una concentración final de 10 ng/mL. Después de 24 horas adicionales de cultivo, se llevó a cabo el ensayo informador de luciferasa utilizando el Sistema de Ensayo de Luciferasa Dual-Glo (Promega) de acuerdo con la instrucción del fabricante. La actividad de luciferasa se midió utilizando un luminómetro F200 PRO (Tecan).

[00196]

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 2.

Como se muestra en la Figura 2, la actividad de luciferasa inducida por la omisión de miostatina casi se suprimió completamente en las células transfectadas con ADN que codifica cada producto de omisión de exón. La Figura 2 indicó que cualquiera de la omisión de exón (exón 5, 6, 7, 8, 9 y 10) podría suprimir de manera eficaz la señal de miostatina.

[00197]

[Ejemplo 5]

Medición de la señal de miostatina

El ARN total extraído (360 ng) se utilizó como una plantilla para llevar a cabo la reacción RT con un Kit de Transcripción Inversa de ADNc de Alta Capacidad (Thermo Fisher Scientific). La preparación de la solución de reacción y las condiciones térmicas fueron seguidas conforme la instrucción del fabricante del kit. El ciclador térmico utilizado fue TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio).

La solución de la reacción RT (0.6 µL) se utilizó como una plantilla para llevar a cabo qPCR con la Mezcla Maestra de Expresión Génica TaqMan (Thermo Fisher Scientific) y los Ensayos de Expresión Génica TaqMan para SMAD7 y PPIB (Thermo Fisher Scientific). El instrumento utilizado para la qPCR fue QuantStudio 6 Flex Systems (Thermo Fisher Scientific).

[00198]

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

Como se muestra en la Figura 3, la expresión del gen SMAD7 se incrementó 6 veces por estimulación con 2 miostatina. Los oligómeros antisentido de la presente invención suprimieron la expresión incrementada del gen SMAD7.

Estos oligómeros antisentido no tienen homología al gen SMAD7 en el análisis BLAST. Por lo tanto, estas actividades inhibidoras de expresión del gen SMAD7 son específicas para la actividad inhibidora de la señal de miostatina.

IDENTIFICADORES DE SECUENCIA:

SEQ ID NO: 1

GACCCUGGGCCUCCACCACCAUCCCCUCUGGUGGGCCUGAAGCCACUGCAGCUGC
UGGAGAUCAAGGCUCGGGGGCGCUUUGGCUGUGUCUGGAAGGCCAGCUCAUGA
AUGACUUUGUAGCUGUCAAGAUCUCCCACUCCAG

SEQ ID NO: 2

GACAAGCAGUCGUGGCAGAGUGAACGGGAGAUCUUCAGCACACCUGGCAUGAAGC
ACGAGAACCUGCUACAGUUCUUGCUGCCGAGAAGCGAGGCUCCAACCUCGAAGU
AGAGCUGUGGCUCAUCACGGCCUCCAUGACAAG

SEQ ID NO: 3

GGCUCCCUCACGGAUUACCUCAAGGGGAACAUCACAUUGGAACGAACUGUGUC
AUGUAGCAGAGACGAUGUCACGAGGCCUCUCAUACCUGCAUGAGGAUGUGCCCUG
GUGCCGUGGCGAGGGCCACAAGCCGUCUAUUGCCCACAG

SEQ ID NO: 4

GGACUUUAAAAGUAAGAAUGUAUUGCUGAAGAGCGACCUCACAGCCGUGCUGGCU
GACUUUGGCUUGGCUGUUCGAUUUGAGCCAGGGAAACCUCAGGGGACACCCACG
GACAG

SEQ ID NO: 5

GUAGGCACGAGACGGUACAUGGCUCCUGAGGUGCUCGAGGGAGCCAUCAACUCC
AGAGAGAUGCCUCCUGCGCAUUGACAUGUAUGCCAUGGGGUUGGUGCUGUGGG
AGCUUGUGUCUCGCUGCAAGGCUGCAGACG

SEQ ID NO: 6

GACCCGUGGAUGAGUACAUGCUGCCCUUUGAGGAAGAGAUUGGCCAGCACCCUUC
GUUGGAGGAGCUGCAGGAGGUGGUGGCACAAGAAGAUGAGGCCACCAUUAAA
GAUCACUGGUUGAAACACCCG

SEQ ID NO: 7 (exón 11 que incluye el codón de detención UAA terminal)

GGCCUGGCCAGCUUUGUGUGACCAUCGAGGAGUGCUGGGACCAUGAUGCAGAG
GCUCGCUUGUCCGCGGGCUGUGUGGAGGAGCGGGUGUCCUGAUUCGGAGGUCG
GUCAACGGCACUACCUCGGACUGUCUCGUUUCUCCUGGUGACCUCUGUCACCAUG
UGGACCUGCCCCCUAAAGAGUCAAGCAUCUAA

SEQ ID NO: 8:

GGCUCGGCUCCGUGGCCGCCGCUCAGGAGCCAUUUUGGACUCGGUUCAGCUCCC
CUCCCCCCCCACCCUCCCCCGUUCAUGGCCCCUCCGGACUCGGCCCCUGCGCCC
GGGGCCCCGGGCCAGCCCCGCCGCGCUAUGCCUGAGUCGGGCGCGCCCCGGCCC
GUGCCCCGCGCGCGCCCCCGGCCCGCGUCGCCCCGGAGCCCGGGCCGCGAGC
CUGCGCCGCCCGCAGCGGCCUGAGCCCGGCCCGCCGACCGGCCCUUGGAGCC
CGAACGCUGCUCGGGGACGAAGGCGCAGGAAGCGCGCAGGGAACGAGACCGAAG
GAAGGAGCGGGAAGGAGAGCGCAGCCGCCGCCUGGCCUGCGCGCCCCGGGAGC
GCCGUGCGGGCCUGCCCGCGGGCUCGCGGGUGUGCGCGGGGCGGCGCCGCGGAA
CAUGACGGCGCCCUGGGUGGCCUCGCCCUCUCCUGGGGAUCGCUGUGCGCCGG
CUCUGGGCGUGGGGAGGCUGAGACACGGGAGUGCAUCUACUACAACGCCAACUG
GGAGCUGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCUGGAGCGCUGCGAAGGCGAGCAGGA
CAAGCGGCUGCACUGCUACGCCUCCUGGCGCAACAGCUCUGGCACCAUCGAGCUC
GUGAAGAAGGGCUGCUGGCUAGAUGACUUAACUGCUACGAUAGGCAGGAGUGUG
UGGCCACUGAGGAGAACCCCCAGGUGUACUUCUGCUGCUGUGAAGGCAACUUCUG
CAACGAACGCUUCACUCAUUUGCCAGAGGCUGGGGGCCCGGAAGUCACGUACGAG
CCACCCCCGACAGCCCCCACCUGCUCACGGUGCUGGCCUACUCACUGCUGCCCA
UCGGGGGCCUUUCCCUCAUCGUCCUGCUGGCCUUUUGGAUGUACCGGCAUCGCA
AGCCCCCUACGGUCAUGUGGACAUCCAUGAGGACCCUGGGCCUCCACCACCAUC
CCCUCUGGUGGGCCUGAAGCCACUGCAGCUGCUGGAGAUCAAGGCUCGGGGGCG
CUUUGGCUGUGUCUGGAAGGCCAGCUCAUGAAUGACUUUGUAGCUGUCAAGAUC
UUCCCACUCCAGGACAAGCAGUCGUGGCAGAGUGAACGGGAGAUUUCAGCACAC
CUGGCAUGAAGCACGAGAACCUGCUACAGUUCAUUGCUGCCGAGAAGCGAGGCUC
CAACCUCGAAGUAGAGCUGUGGCUCAUCACGGCCUCCAUGACAAGGGCUCUCCUC
ACGGAUUACCUCAAGGGGAACAUCAUCAUCAUGGAACGAACUGUGUCAUGUAGCAG

AGACGAUGUCACGAGGCCUCUCAUACCUUGCAUGAGGAUGUGCCCUUGGUGCCGUG
GCGAGGGGCCACAAGCCGUCUAUUGCCCACAGGGACUUUAAAAGUAAGAAUGUAUU
GCUGAAGAGCGACCUCACAGCCGUGCUGGCUGACUUUGGCUUGGCUGUUCGAUU
UGAGCCAGGGAAACCUCCAGGGGACACCCACGGACAGGUAGGCACGAGACGGUAC
AUGGCUCCUGAGGUGCUCGAGGGAGCCAUCAACUCCAGAGAGAUGCCUCCUGC
GCAUUGACAUGUAUGCCAUGGGGUUGGUGCUGUGGGAGCUUGUGUCUCGCUGCA
AGGCUGCAGACGGACCCGUGGAUGAGUACAUGCUGCCCUUUGAGGAAGAGAUUGG
CCAGCACCCUUCGUUGGAGGAGCUGCAGGAGGUGGUGGUGCACAAGAAGAUGAG
GCCACCAUUAAGAUACACUGGUUGAAACACCCGGGCCUGGCCCAGCUUUGUGUG
ACCAUCGAGGAGUGCUGGGACCAUGAUGCAGAGGCUCGCUUGUCCGCGGGCUGU
GUGGAGGAGCGGGUGUCCCUGAUUCGGAGGUCGGUCAACGGCACUACCUCGGAC
UGUCUCGUUUCUUGGUGACCUCUGUCACCAUGUGGACCUGCCCCUAAAGAGU
CAAGCAUCUAAGCCCAGGACAUGAGUGUCUGUCCAGACUCAGUGGAUCUGAAGAA
AAAAGGAAAAAAGUUGUGUUUUGUUUUGGAAAUCCCAUAAAACCAACAAACACAU
AAUUGCAGCUGCUAUUUUACCUUGACUUUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUUUAUA
UUUAUUUAUUUAUUUAUUUUUUGGAUUGGAUCAGUUUUUACCAGCAUAUUGCUC
UACUGUAUCACAAACAGCGGACACGUCAGCAGGCGUUGAGGUGCUGAGCUGUGGA
UGCAGAACCAGCGCCAUGCUGAAGAGCCUCAGCCACCUCUGUCCUUUGGGAUUC
GUUUUUCUCCGCUUUCUCUUUGUUUGUCGUCUCAGAAUCUGUGACACAAAGAAACC
CAUCUCCUGUCUUAGGAAACCUAAUGCUGCAAACUCUACCUAGAGGAACCUUUGAA
GACUGUUACAUAAGAACAUAACCUUCCUCAGAAGAGGAGUUUCCUCUGCCUCUGC
CCUUCUCCCCUGCCUCCCUCUCCUCCCUCCUUUUUAUUUUGUUUUAGUGAGCUUAA
GAAACAGCAGAUGUGUCUUUCACGGAUCUAACGGGUGUUGUCCUGAUCGAGAAAA
AAACUGGGAUAGAGAUUGGUUUGGACUGGAGUUGGAAGGGGAGGACGGUACUGGG
GGUAGGGUUUGGAACAGAGCUACACUGGACUCGGGCACAUUCGGAGCAGCAUCCU
UUAGUAUGGAGGCUACUUCUCAGGUAACCAGGAAUUGAGGGGGAAGGACCUUGUGG
AGGCCGAGCAUUAACAGCAAGAGCGGGGUUUGGAGAAAGUCUGAGAUUGGGUGCA
GCCUUGACUUACCUGCUGGCCUUGACCAGUUUCUUUACUAACUUGGCCUUGGG
CAUAGGAUGAAACAUUUUUUCUGCCCUAAUUUUAAAACUAGGUGAGGGUAGAAUCA
UCACAGGUUAGGAAUACAUUCUUAUAAGACACGAUGCUGUAAAUAACCUUAAUGG
ACGAAAAGUUGAAAUAUUUUUGUUUCCUCUUGGAGCAGUUCAGGGAAAUGCCAC
AGGGGAUUGUCCUGCACAGAUAGGGCAAGAGGAUUUCCUGGGUGGAGUCUGCCAA
GGCCUGCCUCGCUGGGGACCCAGAGUCCUGCACCUCUGGUUCCGCCCCAGGUG
GUGACAUUACUGUCCCCGUUCUGUGGCUCGUGGACAAGACUUUCUCCAGACCCCU

UAAAGUGGUACAUAUUCUAAAAACUGUUUUUCUAUUAUGCCAUAAACCUUGCUCUA
GUCAGUGAAUGUCCUAAUGCUGCUGUUUCAACAUUUGAAUUCUUUUUAAUUUAU
GAAACAUGCUGAAAAUUUUUUUUUCAAACAAAACACACAUCCACAUAUACACAUGC
UUCGCUAUGUGGCUUCCAAGGUUUAAAUUUUGAAAAGUAAAAGAAUAAAACUUCA
CGACCACAGAUCAACCUCAAACCAGAAAUACCUCAGAAUUUUUCUACUUAUGUAAGGU
UUAUUUAUAUUUUUGUUAGUUGUGUUGUCUUGUAGUAAGUAUAUUUUAAUGUAAG
UUGGCUUUUGUGACAAGGAAGUUUAAAAGAAUAGAGAAAAAGAAAAAGUUUGCA
UCUUCUAGGGAGUGCUACCAUUUUUGUUUGAUAAACGCCCCCUUGUAAAUAUUUGU
CAUCAACUGUAGGUUGGCUUGCUGGGCCAAGUCUGGGCAUUUAUCAGUCUUGUUU
GUGAAGGCUUUUCCUUCUGGUUUCUUUAGAUCAUUUUAUUUAAAACAGUGCAUC
UCUUCAUCGUGAGGGUAGGCAAGGCGGGGGCCGUGGGGAGAGGUUGACCUGGGU
GAGAACUGAAGAGGCCGCCUCCUCUUGGGUUGUUUGGAGCUUCACAUGUAAUUCA
CAUGUAACAUGUAACUUGAUCGGUCAGUGUUCAGAAUGACAAGUAACCCCGCUUAA
ACUUGGUAGAAGGAUGGCCCUUAGACCUGAAUGGGGUGAUUUUACUUGGGAUUUA
ACUUCUUCAGCAAAUUAACAGCAACGUUGGAAGAGAUCUGUGGCGCCUCUGUGAA
GCACACCGUGACUCAGGCCAGUCUUUUAGUGCAGCGUGUCUGGGAGUGAAGGGU
UUUGCCCUUGCUGGUCUUGGAGUCCACAGUGUGAGGGGCACUGCACAUGCCUGG
GCAUCUACCUAGUGUGCUAUGUUCAGUGUCUGGGGCUUACUGCCCCGGGGUCCU
UUCUCUGGGUGUUGGGGCACAGGGUGCUAUGGGAGGCCCAUUUUGCUUCCUCU
CGGAGCUCAGUUUUUGCUUCAUGGGUCAAAAUGUGGGCUGGCCAAGUGGUUACAG
GAACAGGGUUUCGGUAAGCUAUGUUGUCUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUUU
AAUGGUUUGAUUUUGUGCUGUGGUAAUUUUUUUCCCUUAGAAUAAUUUUUAAUGG
CAAAACAGGCCUACAGCAGUUGCUUUUCUUUACCAUUUAUUUCUUUAAGAAGCUU
UAAAUAUUUAUUGAAAAGUGCCAUAUCUAAUUUCUUUAGCUUUCGCCUCAGGCAG
UGCAGGCAUCUUUACUUUUAUCCUCAGAAGAAACAAACGACUACAAAUGUAGCA
AAUUUACUGCAGGAUAGUUAGGUCAUGAUACUACCUGAACACUAAACCCAGCCU
CUUUGUUUGGUUUUAGUCCUCUGGGUGGUUUUUCUUUUGUGUGCUGGCUUGAU
UCUUGUGAGAAGUUUUGACCUGGCCAAGGGAGGGUUGAGCCAUGGUUCUGGUGU
GGGACUUUGCGGUCAAGACACAGUACAGACAGGUCAGGCCUGCGUGCCUUUUCUC
UGGGUGGCCUCCCCGUUAGGCCACCGUACGCUCAGCCACUAUAGUGUCCUGUG
GGGCCUUGCCAUCAGAUUGUGUGUCAGGAGAUGGUACCUUUUUGGUGUGGCUGG
GGAGGAGUGUGGUCCAUGCCAGUUCUUUGGGCUUCAGGCCACUCUUCCCCUCAU
GCUGUGGUGUAAAGUGCACCCAUCAGGUGGUUAUUCUGGUUCUGAUGGCAAGAAG
AAGGUGGGGGAUCUCCUUAUAGGGCAUGGGUCUAGGAGCACAGAUGGGCCUUUU

GCCCCGGGUAAAUGCUUGUCUGUUUGCUGUCAUGUGUUCUUUGAGGAGUGAGCC
AUCUCGAGCCCUGCUUUGAAUUUACUGGGUCAUAGAGCCUCUGCCUGUGCUCUUU
UCCAUA AUGACUUCAUGUGACAUGCACUUUUGGUGGGCUCAGAUAAUUGGUUUCU
UUUUGUUUUUGACCUCAGGCUCUGUGGCAGACUGGGGAAAAUGGGGCCUGGCAU
CAUUUUCCCUGUCA AUGGGAGGGGCUGUCCAUGCAGGGUGGGAGGGGACCAAG
UUAGCAGAGAGUAGCCAAGGAUCCUUGCUUCUCCUUUCUAGUGUGCUGUCAUCC
AAGCAGGCUCCUGGCUGUAGGGAUGGGCCUUGGGGAAGAAUCUUCUUUGAAAGCA
UCUAUGAUAAACUGAGAAGUCAUCCCUAGUUGGAGAAAUCCAGUAAUGAGCAGAAGG
AGGAAGCAAGUGAGGACAGAGGCCAUUGUAUUACAGUGUCACGCAGAGGGCCCUC
AAUGAUGGGGCAUUGGGGAAGGCUGUAGACAUAGUCAUCAGAACAUCCUGGCCUG
GCAUAAGCUGGGUUUUCUCCUGGGACCAUUGGUCCUCAGCAGGAGUUCUUUGCAU
GAGUUGCUCAGGGGCAAGGGCUGCAAGUGGGCUGUGCUUAGGAGAAAGUGACAC
CUGGCAGUGAGGGAAGAUGGUGAGCAUUUAUAGCCUUUGUUGUCCAGCAUGGCCU
UCUUGUCCUGUCUGCUCUGGAGAGGAGCCUGUGGGACCAGUCCUGCCUGGGGAG
GGCAUACCCACACGUGCCAGCUGAUUCUGACUCUGAAUACAUCUAGUCCGGACUU
GGGGGUGUUUCUGCAGAAAAAGGAGGUUGUUUUUCAGCCUUGAACAUUCUUCAGGA
GGAUAGAGACUCUUGCUCACAUUUUCUAGCAAAGGGAAGGGUCUCUCAUCUCCA
GGCCACAGAGAUAGUUCUCCAUUGCCCUAAGAGGCUAGGCUAACCCUCUUGACA
UAACUUAGACAGCAAAGCACUUCAUCCUGUAGUUGGGCUCUGUCACCUUUCUCUU
CAGUUGGCCACAUUCUCGUUUCUCCAUCCUGCUAUGCUUUGUGUGCUCGGGCUG
UGUGUGGGGUUUUUCCCUGGUGGAAGGAAGCCCAGCUGUGUAUUGAAUGUCCUU
CAUGUGUUGUGUGUGGUCAGAAAGCCUGUCACUUGGCCCCUGUGCUCUGAGCC
GUGAGGGUGGGGAGGUGGCUGUCCAUAAGUGGGAGUAUUGGAUGGCCUCU
UGAAACUAGAAUUUUGCCUUUUUAGUAUGCAGUAUAAAGUUUCCAGCAUCUAUUG
GUAACACAAAGAUUUGCUGGUUUUAAAAUAAUACAGUAAGCAUAAGUAUGUAAGU
UUUUAGAAUUGGUACUAGAAGUUGGACAGCUAGUUAUUCUGGAGAACUUUAUUUC
ACUAGAAAAUAUACUAAUUGGAAAGCAGUUUCCAGGAGUUAACUCAGUUUAAUUU
UCAGUCUCAGUUAUUUUAGCCUGUUGAGUUUUUGAUGGCACACCUUUGGAGAGAU
GGCCACGCCUGAUUCCCAUUUCAGGGGCAUCAGACCAUACCUUUUUAAAGAGCUC
CGUGAAUCUAGUCAUCUACCCUUCAUCCUGGGCGAACAGCCAAAAAGAGAAGGGG
ACAAGGUGUCUUUUUCUCCUUCUCACUGGGGUGACAUGAAUUCUUUUAGUUAUG
GCUGUUUGCAAUUUCUAAACUAAUGAAAUACUUAGCAGCUAACAUUGUCAAUCUAG
UAAUGAUGAGUUUAAAUUCUCAAUUGACAGUAAUGUUUUAGAUAAACAGGCCCAGUA
AUUCAGUUGAUGAACUGUAUAUCUUCUCAGUCUAGAUUUUGUAAAUGUUUAAUGAAU

UCAGGGUUAUAAGCAUAGUUCUUUAAGUAAGAUUCCAGAUAGUUGAUUUUGCAACCA
GCAGUCUACCUAUGAAUGUAUCCCAAACCUUUAGAAGAUUGGAAAAGAUUUUUGAA
AUAAGAUUUAGUUUUGUAGGAAAAACACCCCUUGAAAAUUAUUCGGUUGACCC
AGUAACAUUUUUUAAAACAAUUGGUGGCUCCAAAGGCCUGCCAACAAAGAAAAGU
CCAAAUUAUCUAGUGGGACAUUUUGAAUGUUUUUAUGUUUAUUUUGGGUCCACUGU
AAACUUUGGUUCAAAAAAGAAUUUGAAUUUAAAGAAUUUACCAUUAUUUAAAUUUU
ACCAAGUUUUUACAUUUUAUGAUGGUUUUCCAGGUUAUGAAUGAAACAUGACUU
UUUGAUUGUGGUACUCCUGUAUCCCCUGUAGUGCCAAAACCAGUGAUACUUUAU
UUGCUCUAUGGCAGCUCUAAGAGGUAACCGAAGUGAUUUUUCCUCAGUAAUUGA
AACACAUAUUCUCUAAAUGCCAAUGUGUGGUGAUGGGCCCUGCACUGCCUUCAUU
UCUCUAGGGCAGUGUCUUUGGAUUGUCUAGGGCCUAGGUAAUUCUGAGAACUACU
GUAACCAACCACAGGGCACUAAAGCAAUGUACACACCACUCUUUGUGUGUAUGGA
AGGGGUUAUAUAAACCUGGGCUAUGCUGGACAUCUACAGAAGAGUAUUACAUAU
CUUGCAAAGUUUACAUUUUUGAGCUCACAGUUAUGAAAAUAUGACCCACAAGUUU
UUCAGGCAGGUGAGGAUGGGUCUUCUUGCAAUGCAUGAGUUCUGUCUUGAGUCC
UGGGAACUUCUCUGUUGGUUGAGUGUGGGCUCAUUCCCUGACUCUCCUAAUCAUG
UUUGCGUCAGAAUGUUAGCAUUGUAAAUAAGAAUAGGUUGUAUAAUAGAUACAC
AACACUUGAAACUUUACUUUAAAAAAUUCGAUAGUUCUACAUAUAUUUAGUUUA
UCACUUGACAGAUUUUCUUCUACACAGUGUGGAGAUUGUUUUUAUACCACAGAUUAU
UUUAUAAAGUUAGUGAAUUUGAAUGAUUUUGUAAUCAGAGCUAAUGAGCUUUACCU
UUCAAGAGAAACGUACACUGGAGCAUGAGUGGUGUGGAACUUUUACUUAGUGUUU
AUAUGGAUUCUUGUGAUACACUGGCAGACUGGAGUCAAUUUGCGGGUCUUUUUG
GCCAAAACUCCACUUGUGGUUGUGUAGGACAGUGAUUUCAGCUCAGCUUCUUGU
GGAUUGGGAGGAGAGAGGGCCUGCAAUGUGUUUUACAUUGGUGCUUCCUCCUGA
GAUUUCUGUUGAACAAAGGGUUCUGAGGUCAAAAUAAGUUUGUAAGCCUUUGCC
AUAGGACAUAGUCAUGUGAGAGUGUUUGGGGGAACAGAAUUGUAUAGGGGUGCC
UAUUGGGGUGGGAUGGGACUCGAAUAAGAUUCAGGUACAAAACUUUGAAAUGAG
AAUCUGGUGGUUUGAGUAAUCCACCAGACUGAAUUAUCUAAGAUCACAUUAUCCAG
GUUGGGGGGCAGAAUUAACCCAGUUAAGUAAUUGUUCAGAAAAGUGGGGAGGGUGG
CAUGUGGAUGCAGUGAUCCAUAUAAUUGGAGAGCUGCCAGGCACAUUUUGUCCUC
UCUGGUCAGUGAGAAUGGUUGGGUUGGCUCGCUUCAAUCUGUGGAAUCAGC
CAGGAGCCCAGUGAGGAAGCUCAGAACCCAGUAACAGCAGAGCAUCUUUCAGAU
AGCUCCAGAGUUUCCUGCUUUUCUGAGGAAGCUCAGCAUCACUGCCACAUAACG
GAAAGUGGUCUUCAUUUUAGCCUAUUUAUUUUUAGGCAGAGAGUGGAUGGUUAU

UGUGUGGGACUUUUGGUGGCGAUUAUAAUGAAUAAUUAAGUUAUUUCUGGUUAU
GCAUAAUGGCCAGUCCUGAGGCCAGCUGAAGACCUGUCCCCAGACCCUGCCCCG
CUGGCUUCAGGCUGCUGCUUCUAGACAGAGGUGCACUGGACGGGAUAGUUUUAUC
AAGAGAAUCCCUAAUGUGUCAUUUUAACCAGCUGUGCUUUUUAUUCAUUCUGGU
UGAGCGUAUAGGUUUACACUUUACCCUUUUUAUACUUGGAUAAAUUUAGUCCAG
CAGAUUCUAGUAGCACUCCAGAAACCAACCCCAUCUGUUCCCCAUAAAAAGAACAUU
UUCUCUGCUCUCCAGCCACGUGUCUUGGAUGUAAUUCUGUUGUGCCUUUGUUUU
UAUCACUCUCUUCGCCCCAAAAGCAACUGCUGUAAGCUUUUUUCUACUUGUCUUU
UCUAGUCCCCAACCUCUACCUUUUUCUUUUUCCAGCCCUAAUUUCUGGAUGCA
CUUCUGUGAUCCAGGUUUUUAAGAACCAGUUACCUCAGACCUCAUGUUGAACAG
UGUCGCCAUCUGGGUCCUCUUGAUACUGCAGACUUUUAACGUACACAUGCAGGAA
CCCUGCUGAGCGUGGGCACUUGUUUUAAGCAAAACUCUUCCCAAGGACUGAAGA
AAGGGCUUCUGGCAAGCUCGUCUUGGCAUUGUGGUGGGAUGGGUCUAGAGUGUC
AUCUGAAUGGUGCUUCCUGUGUCCUCUUUGAAUUCUGCCAUUUUUCAGUAUUCUU
GUGUGUCUGAAUAGGCAAAGCGAUUUAAUUGGCUGGUCUUGCACGCAAAUAGUU
CCAAAGAUAAGCUCUUUGUAACACAUUUCCAGUCGCUAAUGCUCAAAUGUAGAACA
UUCCUUUAAAUGGCAGGAUAAAAAACCCACUAUCCACCAUAGUGCAUUUUGGGAAG
AUGUCUGUAGCAUAUGUUGCUGUGAAAUUAGGCCUUGUGGGAUUAGGCUGUUUGU
CAUUUUGAUGUAUUUUAAAUAUAUAUUAUUUUUAAAAGAGCCUUUUUUUACCAG
UUCAAAAAGUUUAAUUAACCAGCAGUCACCGCAUCUGAAUUUUUGUCUCUGGGGCA
UAGAUGGCAGACCAAGAUUAAAAGUGGUAACUCAGCUAUACGAGCAUGGGCUACC
UUCUGGGCUCUCCUGCAGUCCUGUAGACCGUCUGUUCGCGAGACCAUGGGACAC
AAGGUCAGUGUGUUCUCCAGUGAGGGUCCCAAGUCAGUCAUCUUAAGUGUUUGUUC
UCUGCCCCAUUCAGUGGACUGUUGACUUCAGUCCUGCAAGUGCUUUAGCCCGAG
UGGGGUUUUCUAGAGCACUGCCACGAGUUAAGUGUGUGUUUAGCCAAUAAUUU
CUCCGUAAGGGAAAAAUGCAGUCACCCAAAUUUUACCAACAAUGACAGAGAUGAGA
GUAGAAAAGAUUAGGCAACAUCUGAGUUUUAACUUGAAAAGUGUCCAAGUCAUCAU
GAAAGGCCGACUGGGAGCAAGUGAUUAUUAGAGAUUCUUCAGGAGACCUCAUCUG
AAAUGUUAAAGACUGCCAGUGAGGGAAGGAUUUGUUAAAAUGCCAGCGGCUUUUU
UUUCCUCUUUUUUUCUGUAAUUCUGUAAAAAUGCAGAGAAAGUUGAGUGGUACUU
CAGAAUUGAGGGAGAGGGUUACCGCAGAGUAGAAAUAUAAUUUCUAGAUUUCAGUU
CCACACCACAAAUCCACAACAUGCCAUUUUUCAACUGUACAAAAAUCUGCUUAUG
AACUGGACAUGAUCUUAUUGGUAGUGUCAAGGCCAAGUUUUUCACCUGUUAAUAU
UUUUCACAUUUGUCCUUGAAUCUGAAUAACUUUAUACAGUACUGUAAAUUUAACU

UACAUCGAGUUUGUUGUCAAUUCUUAUGAAAAGAGCUUUCUGCAUGUAACACAUAC
GGUUAAGAACACAGCAAAGGACAAAAUUUGCAGGAACAGUUUUGGAACCAACAGA
AAAUGUCACCUUUUAUUUGCCAUCUUAUAUAUAUCUAUCAGUUUUACCAGCUACUU
CUAAAUUUGUACAUAUUUGUAAGGGAAAGAAGGAAAACCCUAAGACUUGUCUAAC
UUAGUGGAGAAUGUGUGUGUUGGGCUUAGGAUGGAUAGCUAAGUCUUAUUGAGCU
GUGUUACCUAACUUGUAUAUAAAAUUUGUAAUUAAGUUUGGGUUCACCUGUUUC
UCACAGUUUAAAAUGAUGAGUAAUUGCAAACUCUGGAAAUGUGACUAGUAUAUGAU
UUAAGGCUGUAGAAGCAAGGAAGCUCUUUCAAGUGCUAAAACUAAAGACUUCUAGU
UUUUGGCUCAAAUAAGUACUGUUUGUAUACCAGGAUAUGUGAGAUGUAAAUGUAG
UAGGUCACUUUUCACCCUUGUAGCUAUAUUAAAAUUUUUGUAGAACAGAAUAG
CUUGUACUACUGAAUUAACAAAAGUUAUACUAAAGUAUCAUGUUUAAAAAAAAUAUA
UAUAUAUAACAGAGUUAAGCUUGUUGCUGUUACCCUGUCUGGAUUUGAAAAGUG
UGCUGAUUUUAUAUAUAUAUAUUACACACACACACACACACACACACACACACACA
CACACACACACACACACACACACACACACACACACACAUACACCUAAAAUGGCCUAA
AGCAGACAUCCAUGUAAUACAGUUGCAAAAUGAAAACAUUUUGGAAAGAACAUUG
UAUCAUAGUUCAUUCAUUUGCAGUGGAUCUUUGUCCUUUUUACUGUGGUAUUUU
UAGAAAUGAGUGUCAAGUUUGAAAUAAGAUUCUGCUAAGUUGGGGUUUUGCUGCUU
GAACUCUGCACUGGGUCCUCAAUAAACCGAUGUGAAUGUAGUUUUUUCCCCCUG
UGUGAAGAAGCAGUUAACCCCCAACAAUAGGAGGAAAAUUCUAGAACUAAUUCAAG
UUUUAUCUUUUUGUAUAUGAAAAUAAAAUAAUAAUAAAACAA

SEQ ID NO: 9:

AUGUACCGGCAUCGCAAGCCCCCUACGGUCAUGUGGACAUCCAUGAGGACCCUG
GGCCUCCACCACCAUCCCCUCUGGUGGGCCUGAAGCCACUGCAGCUGCUGGAGAU
CAAGGCUCGGGGGCGCUUUGGCUGUGUCUGGAAGGCCAGCUCAUGAAUGACUU
UGUAGCUGUCAAGAUCUUCCACUCCAGGACAAGCAGUCGUGGCAGAGUGAACGG
GAGAUCUUCAGCACACCUGGCAUGAAGCACGAGAACCUGCUACAGUUCAUUGCUG
CCGAGAAGCGAGGCUCCAACCUCGAAGUAGAGCUGUGGCUCAUCACGGCCUCCA
UGACAAGGGCUCUCCUCACGGAUUACCUCAGGGGAACAUCAUCAUGGAACGAA
CUGUGUCAUGUAGCAGAGACGAUGUCACGAGGCCUCUCAUACCUGCAUGAGGAUG
UGCCCUGGUGCCGUGGCGAGGGCCACAAGCCGUCUAUUGCCCACAGGGACUUUAA
AAGUAAGAAUGUAUUGCUGAAGAGCGACCUCACAGCCGUGCUGGCUGACUUUGGC
UUUGGCUGUUCGAUUUGAGCCAGGGAAACCUCCAGGGGACACCCACGGACAGGUAG
GCACGAGACGGUACAUGGCUCCUGAGGUGCUCGAGGGAGCCAUCAACUCCAGAG
AGAUGCCUCCUGCGCAUUGACAUGUAUGCCAUGGGGUUGGUGCUGUGGGAGCU

UGUGUCUCGCU GCAAGGCUGCAGACGGACCCGUGGAUGAGUACAUGCUGCCCUU
UGAGGAAGAGAUUGGCCAGCACCCUUCGUUGGAGGAGCUGCAGGAGGUGGUGGU
GCACAAGAAGAUGAGGCCACCAUUAAGAUCACUGGUUGAAACACCCGGGCCUG
GCCCAGCUUUGUGUGACCAUCGAGGAGUGCUGGGACCAUGAUGCAGAGGCUCGC
UUGUCCGCGGGCUGUGUGGAGGAGCGGGUGUCCUGAUUCGGAGGUCGGUCAAC
GGCACUACCUCGGACUGUCUGUUUCCUGGUGACCUCUGUCACCAUGUGGACC
UGCCCCCUAAAGAGUCAAGCAUCUAA

SEQ ID NO: 10.

ATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCGCTGTGCGCCGGCTC
TGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGTGCATCTACTACAACGCCAACTGGGAGC
TGGAGCGCACCAACCAGAGCGGCCTGGAGCGCTGCGAAGGCGAGCAGGACAAGCG
GCTGCACTGCTACGCCTCCTGGCGCAACAGCTCTGGCACCATCGAGCTCGTGAAGA
AGGGCTGCTGGCTAGATGACTTCAACTGCTACGATAGGCAGGAGTGTGTGGCCACTG
AGGAGAACCCCCAGGTGTACTTCTGCTGCTGTGAAGGCAACTTCTGCAACGAACGCT
TCACTCATTGCGCAGAGGCTGGGGGCCCGGAAGTCACGTACGAGCCACCCCCGACA
GCCCCACCTGCTCACGGTGTGGCCTACTCACTGCTGCCCATCGGGGGCCTTTC
CCTCATCGTCCTGCTGGCCTTTTGGATGTACCGGCATCGCAAGCCCCCTACGGTCA
TGTGGACATCCATGAGGACCCTGGGCCTCCACCACCATCCCCTCTGGTGGGCCTGA
AGCCACTGCAGCTGCTGGAGATCAAGGCTCGGGGGCGCTTTGGCTGTGTCTGGAAG
GCCCAGCTCATGAATGACTTTGTAGCTGTCAAGATCTTCCCACTCCAGGACAAGCAGT
CGTGGCAGAGTGAACGGGAGATCTTCAGCACACCTGGCATGAAGCACGAGAACCTG
CTACAGTTCATTGCTGCCGAGAAGCGAGGCTCCAACCTCGAAGTAGAGCTGTGGCTC
ATCACGGCCTTCCATGACAAGGGCTCCCTCACGGATTACCTCAAGGGGAACATCATC
ACATGGAACGAACTGTGTATGTAGCAGAGACGATGTCACGAGGCCTCTCATACCTG
CATGAGGATGTGCCCTGGTGCCGTGGCGAGGGCCACAAGCCGTCTATTGCCACAG
GGACTTTAAAAGTAAGAATGTATTGCTGAAGAGCGACCTCACAGCCGTGCTGGCTGA
CTTTGGCTTGGCTGTTGATTTGAGCCAGGGAAACCTCCAGGGGACACCCACGGACA
GGTAGGCACGAGACGGTACATGGCTCCTGAGGTGCTCGAGGGAGCCATCAACTTCC
AGAGAGATGCCTTCCTGCGCATTGACATGTATGCCATGGGGTTGGTGCTGTGGGAGC
TTGTGTCTCGCTGCAAGGCTGCAGACGGACCCGTGGATGAGTACATGCTGCCCTTTG
AGGAAGAGATTGGCCAGCACCCCTTCGTTGGAGGAGCTGCAGGAGGTGGTGGTGAC
AAGAAGATGAGGCCACCATTAAGATCACTGGTTGAAACACCCGGGCCTGGCCCAG
CTTTGTGTGACCATCGAGGAGTGTGGGACCATGATGCAGAGGCTCGCTTGTCCGC
GGGCTGTGTGGAGGAGCGGGTGTCCCTGATTCGGAGGTGGTCAACGGCACTACCT

CGGACTGTCTCGTTTCCCTGGTGACCTCTGTACCAATGTGGACCTGCCCCCTAAAG
AGTCAAGCATCTAA

SEQ ID NO: 11.

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys Ala
Gly Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala
Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly
Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr
Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys
Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala
Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr Leu Leu
Thr Val Leu Ala Tyr Ser Leu Leu Pro Ile Gly Gly Leu Ser Leu Ile Val
Leu Leu Ala Phe Trp Met Tyr Arg His Arg Lys Pro Pro Tyr Gly His Val
Asp Ile His Glu Asp Pro Gly Pro Pro Pro Pro Ser Pro Leu Val Gly Leu
Lys Pro Leu Gln Leu Leu Glu Ile Lys Ala Arg Gly Arg Phe Gly Cys Val
Trp Lys Ala Gln Leu Met Asn Asp Phe Val Ala Val Lys Ile Phe Pro Leu
Gln Asp Lys Gln Ser Trp Gln Ser Glu Arg Glu Ile Phe Ser Thr Pro Gly
Met Lys His Glu Asn Leu Leu Gln Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg Gly Ser
Asn Leu Glu Val Glu Leu Trp Leu Ile Thr Ala Phe His Asp Lys Gly Ser
Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Gly Asn Ile Ile Thr Trp Asn Glu Leu Cys His
Val Ala Glu Thr Met Ser Arg Gly Leu Ser Tyr Leu His Glu Asp Val Pro
Trp Cys Arg Gly Glu Gly His Lys Pro Ser Ile Ala His Arg Asp Phe Lys
Ser Lys Asn Val Leu Leu Lys Ser Asp Leu Thr Ala Val Leu Ala Asp Phe
Gly Leu Ala Val Arg Phe Glu Pro Gly Lys Pro Pro Gly Asp Thr His Gly
Gln Val Gly Thr Arg Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Gly Ala Ile
Asn Phe Gln Arg Asp Ala Phe Leu Arg Ile Asp Met Tyr Ala Met Gly Leu
Val Leu Trp Glu Leu Val Ser Arg Cys Lys Ala Ala Asp Gly Pro Val Asp
Glu Tyr Met Leu Pro Phe Glu Glu Glu Ile Gly Gln His Pro Ser Leu Glu
Glu Leu Gln Glu Val Val Val His Lys Lys Met Arg Pro Thr Ile Lys Asp
His Trp Leu Lys His Pro Gly Leu Ala Gln Leu Cys Val Thr Ile Glu Glu
Cys Trp Asp His Asp Ala Glu Ala Arg Leu Ser Ala Gly Cys Val Glu Glu
Arg Val Ser Leu Ile Arg Arg Ser Val Asn Gly Thr Thr Ser Asp Cys Leu
Val Ser Leu Val Thr Ser Val Thr Asn Val Asp Leu Pro Pro Lys Glu Ser
Ser Ile