CONJUGADOS DE OLIGÓMEROS DE SALTO DE EXONES PARA DISTROFIA MUSCULAR

SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de EE. UU. n.º 62/779 028, presentada el 13 de diciembre de 2018. El contenido total de la solicitud a la que se ha hecho referencia anteriormente se incorpora por referencia en su totalidad.

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS REMITIDO ELECTRÓNICAMENTE A TRAVÉS DE LA WEB EFS

El contenido del listado de secuencias remitido electrónicamente (Nombre: 8171_50_WO00_SL.txt; tamaño: 10 080 bytes; fecha de creación: 6 de noviembre de 2019) presentado simultáneamente junto con la presente y se incorpora a la misma por referencia en su totalidad.

CAMPO DE LA DIVULGACIÓN

La presente divulgación se refiere a oligómeros antisentido novedosos adecuados para el salto del exón 50 en el gen de distrofina humano y composiciones farmacéuticas de estos. La divulgación también proporciona métodos para inducir el salto del exón 50 utilizando los oligómeros antisentido novedosos, métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina susceptible de salto del exón 50, y métodos para tratar a un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina susceptible de salto del exón 50.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) está causada por un defecto en la expresión de la proteína de distrofina. El gen que codifica la proteína contiene 79 exones diseminados en más de 2 millones de nucleótidos de ADN. Cualquier mutación exógena que cambie el marco de lectura del exón o introduce un codón de parada, o se caracteriza por la eliminación de un exón o exones completos fuera del marco, o duplicaciones de uno o más exones, tiene el potencial para alterar la producción de la distrofina funcional, lo que da lugar a DMD.

Se ha observado que aparece una forma menos grave de distrofia muscular, la distrofia muscular de Becker (BMD), cuando una mutación, habitualmente una deleción de uno o más exones, da como resultado un marco de lectura correcto junto con el transcrito de distrofina total, de modo que la traducción de ARNm en la proteína no termine de forma prematura. Si la unión de los exones en dirección 5’ y dirección 3’ en el procesamiento de un pre-ARNm de distrofina mutado mantiene el marco de lectura correcto del gen, el resultado es un ARNm que codifica una proteína con una deleción

interna corta que conserva algo de actividad, lo que da como resultado un fenotipo de Becker.

Existe una necesidad de oligómeros antisentido que sean adecuados para el salto del exón 50 y composiciones farmacéuticas correspondientes que sean útiles para métodos terapéuticos de producción de distrofina y tratamiento de DMD.

COMPENDIO DE LA DIVULGACIÓN

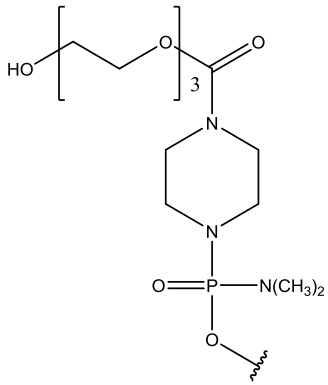
Los oligómeros antisentido, o las sales farmacéuticamente aceptables de estos, son capaces de unirse a una diana seleccionada para inducir salto de exones en el gen de distrofina humano, donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria respecto a una región diana del exón 50 del pre-ARNm de distrofina diseñado como un sitio de hibridación, donde la secuencia de bases y el sitio de hibridación se seleccionan entre:

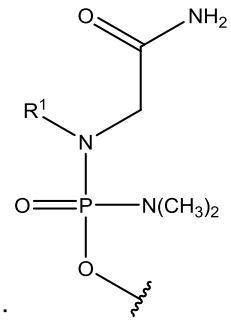
Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde T es timina o uracilo. En un aspecto, cada T es timina.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, el oligómero antisentido contiene un resto **T** unido al extremo 5' del oligómero antisentido, donde el resto **T** se selecciona entre:



;


; y

.

En determinadas realizaciones, el oligómero antisentido se conjuga con uno o más péptidos que penetran en las células (denominados en la presente como “CPP”). En determinadas realizaciones, se unen uno o más CPP a un extremo del oligómero antisentido. En determinadas realizaciones, se une al menos un CPP al extremo 5’ del oligómero antisentido. En determinadas realizaciones, se une al menos un CPP al extremo 3’ del oligómero antisentido. En determinadas realizaciones, se une un primer CPP al extremo 5’ y se une un segundo CPP al extremo 3’ del oligómero antisentido.

En algunas realizaciones, el CPP es un péptido rico en arginina. La expresión “rica en arginina” se refiere a un CPP que tiene al menos 2, y preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 residuos de arginina, cada uno separado opcionalmente por uno o más residuos hidrófobos no cargados y que contienen opcionalmente aproximadamente 6-14 residuos de aminoácidos. Tal como se explica más adelante, un CPP se une preferentemente por su extremo carboxi al extremo 3’ y/o 5’ de un oligonucleótido antisentido a través de un conector, que puede ser también uno o más aminoácidos, y preferentemente también rematado en su extremo amino con un sustituyente R^a con R^a seleccionado entre H, acilo, acetilo, benzoílo o estearoílo. En algunas realizaciones, R^a es acetilo.

Como se observa en la tabla a continuación, los ejemplos no limitantes de CPP para su uso en la presente incluyen -$(RXR)_4$-R^a (SEQ ID NO: 15), -R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 16), -B-X-$(RXR)_4$-R^a (SEQ ID NO: 17), -B-X-R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 18), -GLY-R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 19), -GLY-R_5-R^a (SEQ ID NO: 20), –R_5-R^a (SEQ ID NO: 21), -GLY-R_6-R^a (SEQ ID NO: 11) y –R_6-R^a (SEQ ID NO: 10), donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo, y donde R es arginina, X es ácido 6-aminohexanoico, B es β-alanina, F es fenilalanina y GLY (o G) es glicina. Se pretende que el CPP "R_5 (SEQ ID NO: 21)” indique un péptido de cinco (5) residuos de arginina unidos entre sí mediante enlaces amida (y no un único sustituyente, por ejemplo, R^5 (SEQ ID NO: 21)). Se pretende que el CPP "R_6 (SEQ ID NO: 10)” indique un péptido de

seis (6) residuos de arginina unidos entre sí mediante enlaces amida (y no un único sustituyente, por ejemplo, R^6 (SEQ ID NO: 10)). En algunas realizaciones, R^a es acetilo.

Se proporcionan CPP ilustrativos en la **Tabla 1** (SEQ ID NO: 10, 11 y 15-21).

Tabla 1: Péptidos que penetran células ilustrativos		
Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
R_6G	RRRRRRG	11
R_6	RRRRRR	10
$(RXR)_4$	RXRRXRRXRRXR	15
$(RFF)_3R$	RFFRFFRFFR	16
$(RXR)_4XB$	RXRRXRRXRRXRXB	17
$(RFF)_3RXB$	RFFRFFRFFRXB	18
$(RFF)_3RG$	RFFRFFRFFRG	19
R_5G	RRRRRG	20
R_5	RRRRR	21
R es arginina; X es ácido 6-aminohexanoico; B es β-alanina; F es fenilalanina; G es glicina.		

Los CPP, su síntesis y los métodos para conjugarlos a un oligómero se describen adicionalmente en la Publicación de Solicitud de EE. UU. N.º US 2012/0289457 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.os WO 2004/097017, WO 2009/005793 y WO 2012/150960, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido antisentido comprende un sustituyente "Z," definido como la combinación de un CPP y un conector. El conector actúa como puente entre el CPP en su extremo carboxi hacia el extremo 3' y/o el extremo 5' del oligonucleótido. En varias realizaciones, un oligonucleótido antisentido puede comprender solamente un CPP unido al extremo 3' del oligómero. En otras realizaciones, un oligonucleótido antisentido puede comprender solamente un CPP unido al extremo 5' del oligómero.

El conector dentro de Z puede comprender, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

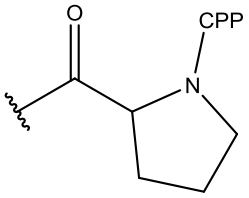
En realizaciones particulares, Z se selecciona entre:

$-C(O)(CH_2)_5NH$-CPP;

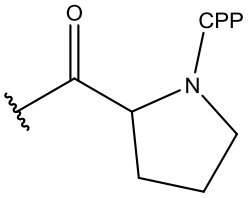
$-C(O)(CH_2)_2NH$-CPP;

$-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH$-CPP;

$-C(O)CH_2NH$-CPP; y la fórmula:

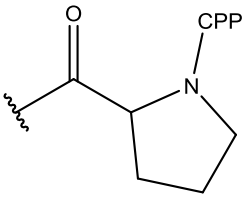


donde el CPP se une al resto conector mediante un enlace amida en el extremo carboxi del CPP.

En varias realizaciones, el CPP es un péptido rico en arginina tal como se describe en la presente y se observa en la Tabla 1. En varias realizaciones, el CPP rico en arginina es $-R_5-R^a$, (es decir, cinco residuos de arginina; SEQ ID NO: 21), donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo. En determinadas realizaciones, R^a es acetilo. En varias realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 21, y el conector se selecciona del grupo constituido por $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)CH_2NH-$ y 

. En algunas realizaciones, el conector comprende 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 21 y el conector es Gly. En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 20.

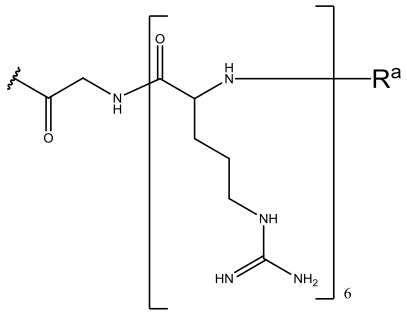
En determinadas realizaciones, el CPP rico en arginina es $-R_6-R^a$, (es decir, seis residuos de arginina; SEQ ID NO: 10), donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo. En determinadas realizaciones, R^a es acetilo. En varias realizaciones, el CPP se selecciona entre las SEQ ID NO: 10, 15 o 16, y el conector se selecciona del grupo constituido por $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)CH_2NH-$ y 

. En algunas realizaciones, el conector comprende 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 10 y el conector es Gly. En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 11.

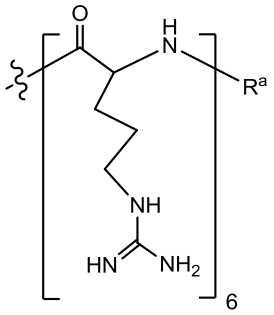
En determinadas realizaciones, Z es $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ ("R_6" se divulga como la SEQ ID NO: 10) unida covalentemente a un oligómero antisentido de la divulgación

en el extremo 5' y/o 3' del oligómero, donde R^a es H, acilo, acetilo, benzoílo o estearoílo para rematar el extremo amino del R_6 (SEQ ID NO: 10). En determinadas realizaciones, R^a es acetilo. En estos ejemplos no limitantes, el CPP es $–R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 10) y el conector es $-C(O)CH_2NH-$, (es decir, GLY). Este ejemplo particular de Z = $-C(O)CH_2NH-R_6-R^a$ ("R_6" se divulga como la SEQ ID NO: 10) también se ilustra con la siguiente estructura:



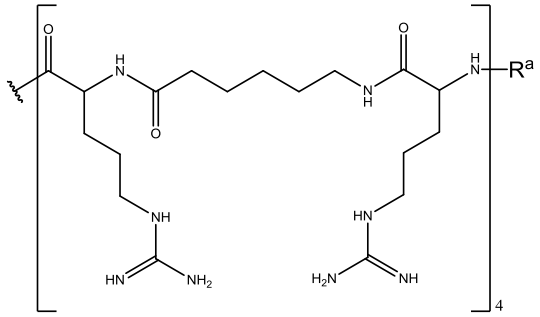
donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo. En algunas realizaciones, R^a es acetilo.

En varias realizaciones, el CPP es $-R_6-R^a$ (SEQ ID NO: 10), también se ilustra como la siguiente fórmula:



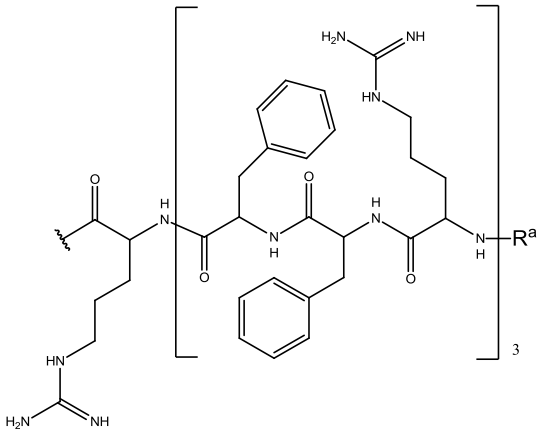
donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo. En determinadas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, R^a es acetilo.

En algunas realizaciones, el CPP es $–(RXR)_4-R^a$ (SEQ ID NO: 15), también se ilustra como la siguiente fórmula:



.

En varias realizaciones, el CPP es –R-(FFR)$_3$-R^a (SEQ ID NO: 16), también se ilustra como la siguiente fórmula:



.

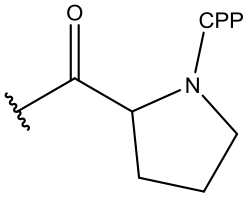
En varias realizaciones, Z se selecciona entre:

-C(O)(CH$_2$)$_5$NH-CPP;

-C(O)(CH$_2$)$_2$NH-CPP;

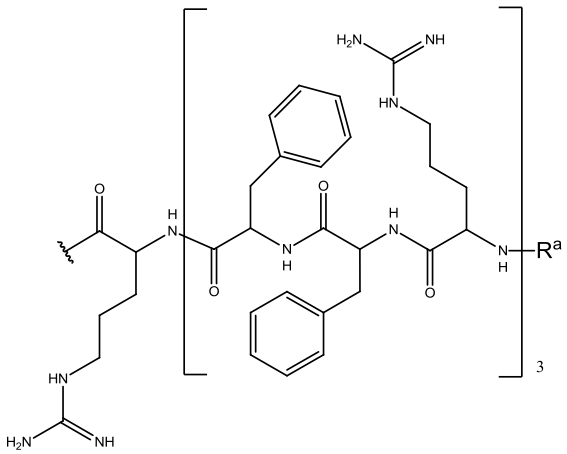
-C(O)(CH$_2$)$_2$NHC(O)(CH$_2$)$_5$NH-CPP;

-C(O)CH$_2$NH-CPP y la fórmula:

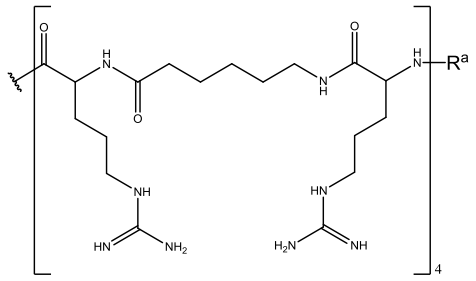


,

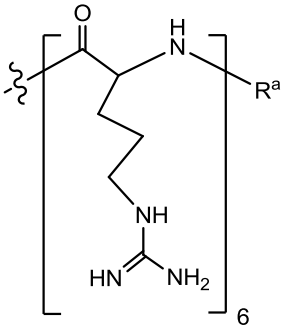
donde el CPP se une al resto conector mediante un enlace amida en el extremo carboxi del CPP, y donde el CPP se selecciona entre:



, (-R-(FFR)$_3$-R^a) (SEQ ID NO: 16),



, (-(RXR)$_4$-Rª) (SEQ ID NO: 15),



y (-R$_6$-Rª) (SEQ ID NO: 10). En algunas realizaciones, Rª es acetilo.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO: 3.

En algunos aspectos, las nucleobases del oligómero antisentido modificado se unen a estructuras de anillos morfolino, donde las estructuras de anillos morfolino se unen mediante enlaces intersubunidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una estructura de anillo a un carbono exocíclico 5’ de una estructura de anillo adyacente.

En algunos aspectos, las nucleobases del oligómero antisentido están unidas a un ácido peptidonucleico (APN), donde el esqueleto polinucleotídico de azúcares fosfato se reemplaza por un polímero pseudopeptídico flexible al cual se unen las nucleobases.

En algunos aspectos, al menos una de las nucleobases del oligómero antisentido se une a un ácido nucleico bloqueado (ANB), donde la estructura de ácido nuclecio bloqueado es un análogo nucleotídico que se modifica químicamente, donde el resto de ribosa tiene un puente extra que une el oxígeno 2’ y el carbono 4’.

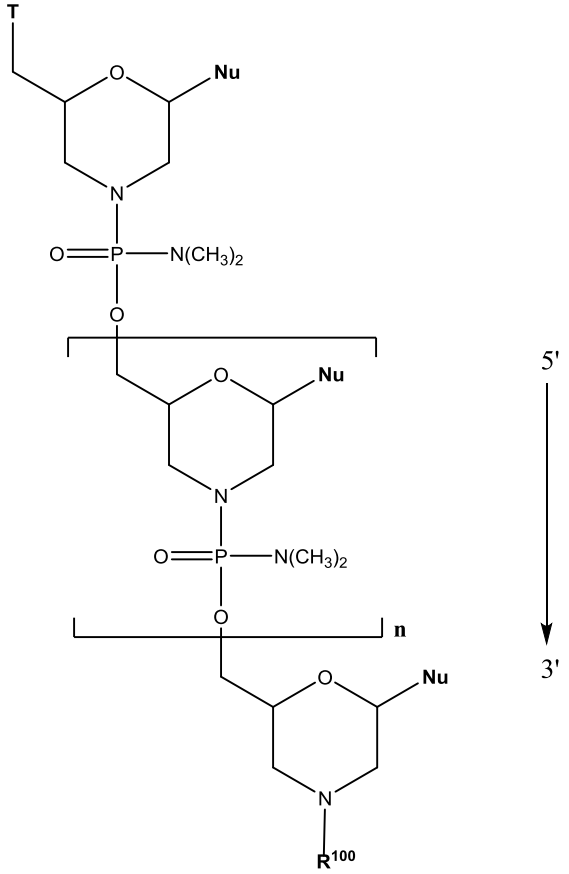
En algunos aspectos, al menos una de las nucleobases del oligómero antisentido se une a un ácido nucleico con puente (BNA), donde la conformación del azúcar se restringe o se bloquea mediante la introducción de una estructura con puente adicional en el esqueleto de furanosa. En algunos aspectos, al menos una de las nucleobases del oligómero antisentido se une a un ácido nucleico puenteado con 2'-O,4'-C-etileno (ANE).

En algunos aspectos, el oligómero antisentido modificado puede contener subunidades de ácido nucleico desbloqueado (UNA). Los UNA y los oligómeros de UNA son un análogo de ARN en el que el enlace C2′-C3’ de la subunidad ha sido escindido.

En algunos aspectos, el oligómero antisentido modificado contiene uno o más fosforotioatos (o S-oligos), en los cuales uno de los oxígenos que no actúan como puente se reemplaza por un azufre. En algunos aspectos, el oligómero antisentido modificado contiene uno o más 2' O-Metil, 2' O-MOE, MCE y 2’-F en los cuales el 2’-OH de la ribosa se sustituye con un grupo metilo, metoxietilo, 2-(N-metilcarbamoil)etilo o fluoro, respectivamente.

En algunos aspectos, el oligómero antisentido modificado es un triciclo-ADN (tc-ADN) que es un análogo de ADN restringido en el cual cada nucleótido se modifica mediante la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional del esqueleto y para optimizar la geometría del esqueleto del ángulo de torsión γ.

En varios aspectos, la divulgación proporciona oligómeros antisentido de acuerdo con la Fórmula (I):

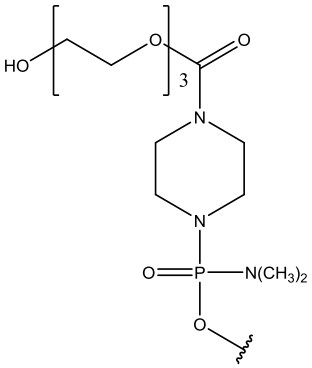


(I)

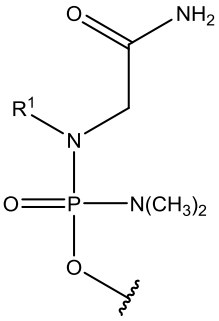
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, donde:

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

T es un resto seleccionado entre:



;



; y

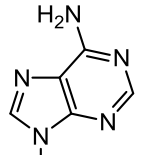
; y el –OH o –NH_2 distal del resto T está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

R^{100} es hidrógeno o un péptido que penetra en las células;

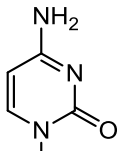
cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5’ a 3’]**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

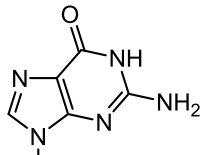
donde A es



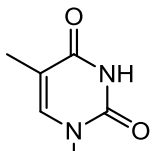
, C es



, G es



y T es

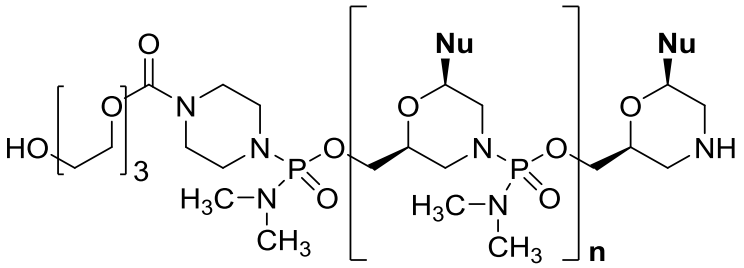


.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a las nucleobases de una de las siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona oligómeros antisentido de Fórmula (II):

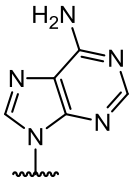
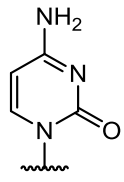
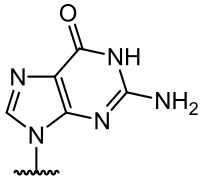
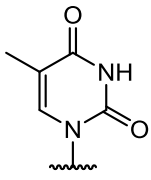
[5'] [3']



(II)

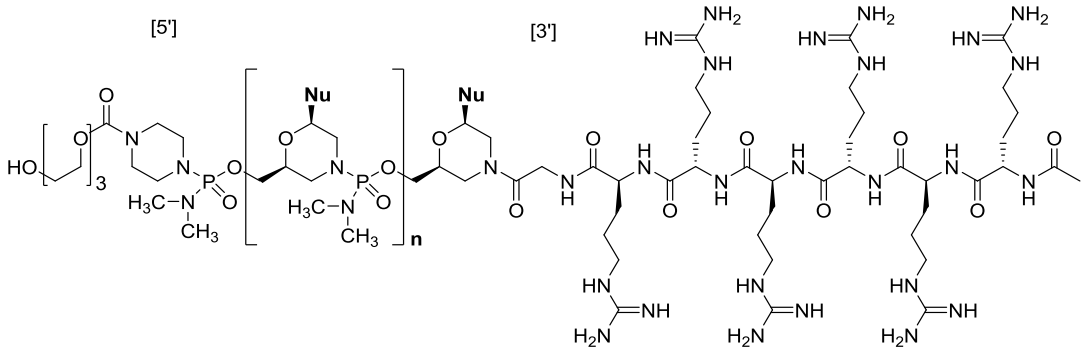
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde A es  , C es  , G es  y T es  . En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (II) se une a un péptido que penetra en las células.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a la SEQ ID NO: 3.

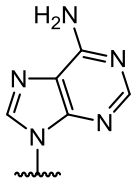
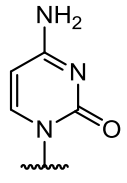
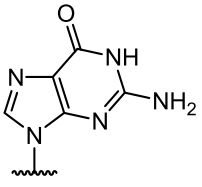
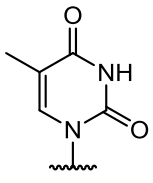
En otro aspecto, la divulgación proporciona oligómeros antisentido de Fórmula (III):



(III)

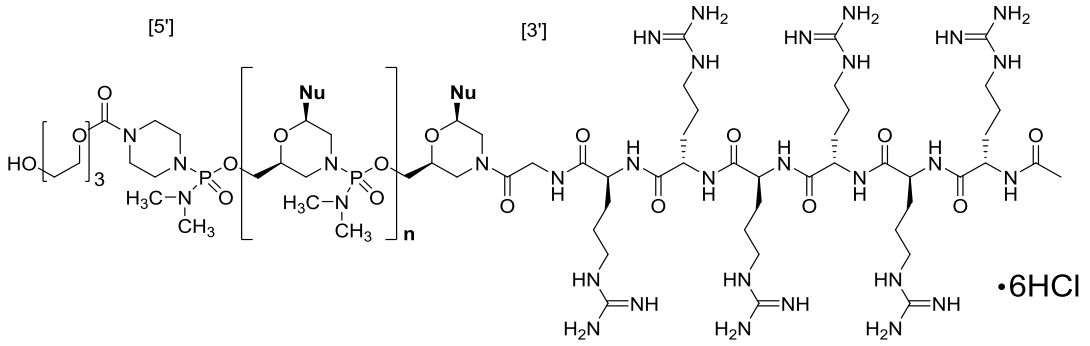
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde A es  , C es  , G es  y T es  . En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (III) se une a un péptido que penetra en las células.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a la SEQ ID NO: 3.

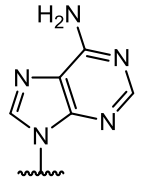
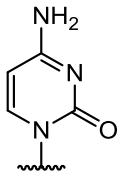
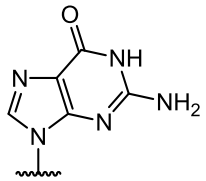
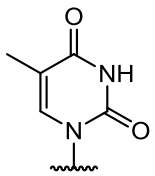
En otro aspecto, la divulgación proporciona oligómeros antisentido de Fórmula (IV):



(IV)

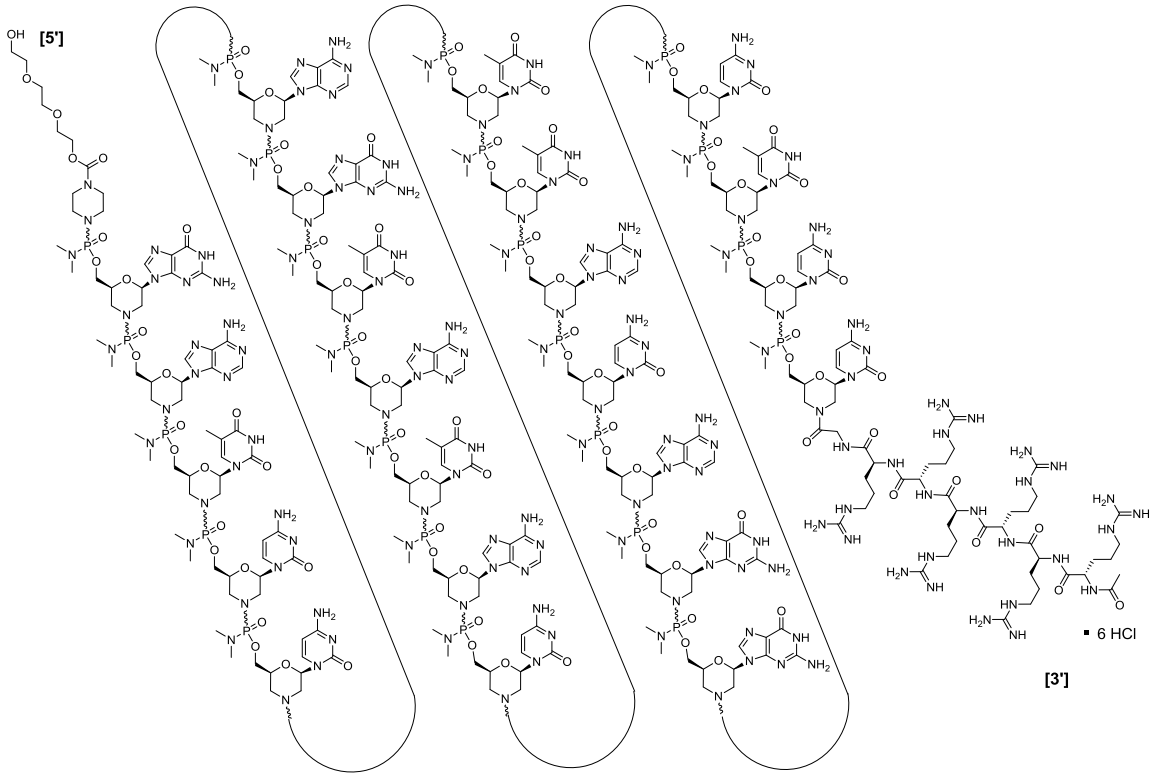
donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

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

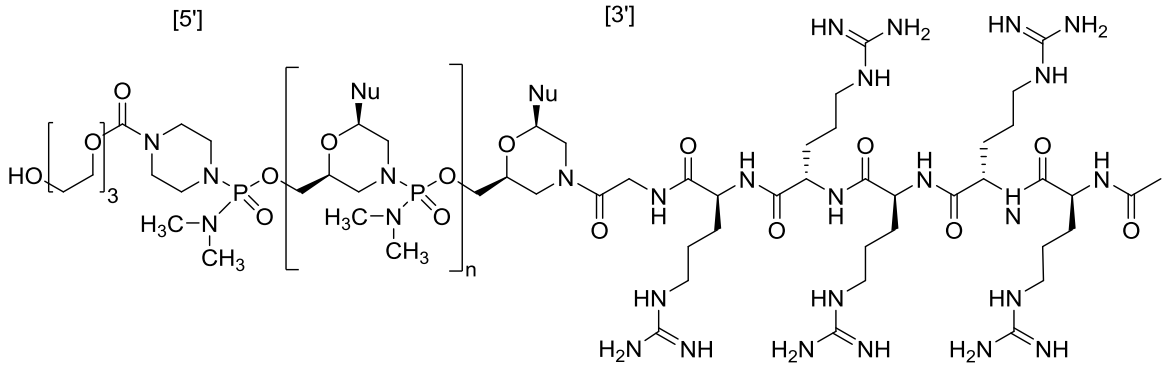
En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a la SEQ ID NO: 3.

En algunas de las realizaciones para la Fórmula (IV), el oligómero antisentido es acorde a la Fórmula (IVa).



(**IVa**)

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

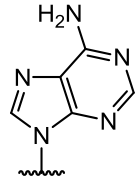
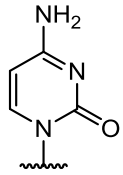
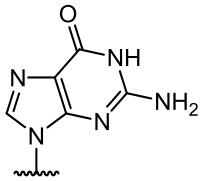
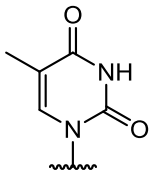


(V)

donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2

H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde A es  , C es  , G es  y T es  . En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO: 3.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto que lo necesite, donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de un salto del exón 50, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligómero antisentido de la divulgación. La divulgación también aborda el uso de oligómeros antisentido de la divulgación para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto que lo necesite, donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para reestablecer un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de un salto del exón 50, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligómero antisentido de la divulgación. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para excluir el exón 50 del preARNm de distrofina durante el procesamiento de ARNm en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de un salto del exón 50, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligómero antisentido de la divulgación. En otro aspecto, la divulgación proporciona un método para unir el exón 50, intrón 49 y/o intrón 50 del preARNm de distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de un salto del exón 50, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligómero antisentido de la divulgación.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un oligómero antisentido de la divulgación en la presente para su uso en terapia. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un oligómero antisentido de la divulgación para su uso en el

tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un oligómero antisentido de la divulgación para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia. En determinadas realizaciones, la divulgación proporciona un oligómero antisentido de la divulgación para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

En otro aspecto, la divulgación también proporciona kits para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto que lo necesite, donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50, donde dichos kits comprenden al menos un oligómero antisentido de la presente divulgación, envasado en un recipiente adecuado e instrucciones para su uso.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA DIVULGACIÓN

Las realizaciones de la presente divulgación se refieren en general a oligómeros antisentido mejorados y métodos de uso de estos, que se diseñan específicamente para que induzcan salto de exones en el gen de distrofina humano. La distrofina desempeña una función vital en la función muscular y varias enfermedades relacionadas con los músculos se caracterizan por formas mutadas de este gen. Por tanto, en determinadas realizaciones, los oligómeros antisentido mejorados descritos en la presente inducen salto de exones en formas mutadas del gen de distrofina humano tales como los genes de distrofina mutados observados en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD).

Debido a eventos de corte y empalme de ARNm aberrantes causados por mutaciones, estos genes de distrofina humanos mutados expresan una proteína de distrofina defectuosa o no expresan ninguna distrofina medible en absoluto, una afección que da lugar a varias formas de distrofia muscular. Para remediar esta afección, los oligómeros antisentido de la presente divulgación se hibridan con regiones seleccionadas de un ARNm preprocesado de un gen de distrofina humano mutado, inducen salto de exones y corte y empalme diferencial en ese ARNm de distrofina con corte y empalme aberrante de otro modo, y de ese modo permiten que las células musculares produzcan un transcrito de ARNm que codifique una proteína de distrofina funcional. En determinadas realizaciones, la proteína de distrofina resultante no es necesariamente la forma “de origen natural” de la distrofina, sino que es una forma truncada pero funcional de distrofina.

Al aumentar los niveles de proteína de distrofina funcional en las células musculares, estas y otras realizaciones relacionadas son útiles en la profilaxis y el

tratamiento de la distrofia muscular, especialmente aquellas formas de distrofia muscular tales como la DMD y la BMD que se caracterizan por la expresión de proteínas de distrofina defectuosas debido a un corte y empalme de ARNm aberrante. Los oligómeros antisentido específicos descritos en la presente proporcionan además un mejor direccionamiento a exones específicos de distrofina sobre otros oligómeros, y de este modo, ofrecen ventajas significativas y prácticas sobre métodos alternativos para tratar formas relevantes de distrofia muscular.

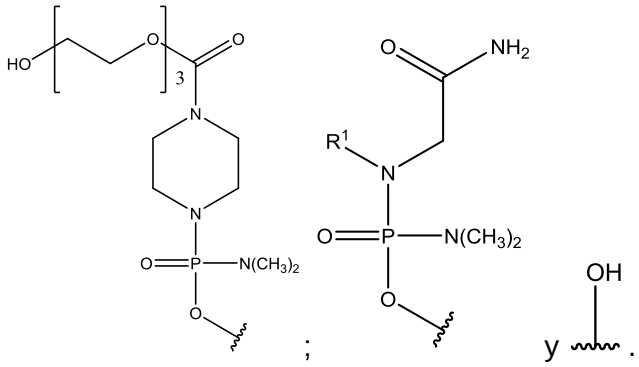
Por tanto, la divulgación se refiere a oligómeros antisentido o sales farmacéuticamente aceptables de estos, capaces de unirse a una diana seleccionada para inducir salto de exones en el gen de distrofina humano, donde los oligómeros antisentido comprenden una secuencia de bases que es complementaria respecto a una región diana del exón 50 del pre-ARNm de distrofina diseñado como un sitio de hibridación, donde la secuencia de bases y el sitio de hibridación se seleccionan entre:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde T es timina o uracilo.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes: SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de la SEQ ID NO: 3.

En un aspecto, el oligómero antisentido contiene un resto **T** unido al extremo 5' del oligómero antisentido, donde el resto **T** se selecciona entre:



En determinadas realizaciones, el oligómero antisentido se conjuga con uno o más péptidos que penetran en las células (denominados en la presente como “CPP”). En determinadas realizaciones, se unen uno o más CPP a un extremo del oligómero antisentido. En determinadas realizaciones, se une al menos un CPP al extremo 5’ del oligómero antisentido. En determinadas realizaciones, se une al menos un CPP al extremo 3’ del oligómero antisentido. En determinadas realizaciones, se une un primer CPP al extremo 5’ y se une un segundo CPP al extremo 3’ del oligómero antisentido.

En algunas realizaciones, el CPP es un péptido rico en arginina. La expresión “rica en arginina” se refiere a un CPP que tiene al menos 2, y preferentemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 residuos de arginina, cada uno separado opcionalmente por uno o más residuos hidrófobos no cargados y que contienen opcionalmente aproximadamente 6-14 residuos de aminoácidos. Tal como se explica más adelante, un CPP se une preferentemente por su extremo carboxi al extremo 3’ y/o 5’ de un oligonucleótido antisentido a través de un conector, que puede ser también uno o más aminoácidos, y preferentemente también rematado en su extremo amino con un sustituyente R^a con R^a seleccionado entre H, acilo, acetilo, benzoílo o estearoílo. En algunas realizaciones, R^a es acetilo.

Como se observa en la tabla a continuación, los ejemplos no limitantes de CPP para su uso en la presente incluyen -$(RXR)_4$-R^a (SEQ ID NO: 15), R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 16), -B-X-$(RXR)_4$-R^a (SEQ ID NO: 17), -B-X-R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 18), -GLY-R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 19), -GLY-R_5-R^a (SEQ ID NO: 20), –R_5-R^a (SEQ ID NO: 21), -GLY-R_6-R^a (SEQ ID NO: 11) y –R_6-R^a (SEQ ID NO: 10), donde R^a se selecciona entre H, acilo, benzoílo y estearoílo, y donde R es arginina, X es ácido 6-aminohexanoico, B es β-alanina, F es fenilalanina y GLY (o G) es glicina. Se pretende que el CPP "R_5 (SEQ ID NO: 21)” indique un péptido de cinco (5) residuos de arginina unidos entre sí mediante enlaces amida (y no un único sustituyente, por ejemplo, R^5 (SEQ ID NO: 21)). Se pretende que el CPP "R_6 (SEQ ID NO: 10)” indique un péptido de seis (6) residuos de

arginina unidos entre sí mediante enlaces amida (y no un único sustituyente, por ejemplo, R^6 (SEQ ID NO: 10)). En algunas realizaciones, R^a es acetilo.

Se proporcionan CPP ilustrativos en la **Tabla 1** (SEQ ID NO: 10, 11 y 15-21).

Tabla 1: Péptidos que penetran células ilustrativos		
Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
R_6G	RRRRRRG	11
R_6	RRRRRR	10
$(RXR)_4$	RXRRXRRXRRXR	15
$(RFF)_3R$	RFFRFFRFFR	16
$(RXR)_4XB$	RXRRXRRXRRXRXB	17
$(RFF)_3RXB$	RFFRFFRFFRXB	18
$(RFF)_3RG$	RFFRFFRFFRG	19
R_5G	RRRRRG	20
R_5	RRRRR	21
R es arginina; X es ácido 6-aminohexanoico; B es β-alanina; F es fenilalanina; G es glicina.		

Los CPP, su síntesis y los métodos para conjugarlos a un oligómero se describen adicionalmente en la Publicación de Solicitud de EE. UU. N.º US 2012/0289457 y la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.os WO 2004/097017, WO 2009/005793 y WO 2012/150960, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido antisentido comprende un sustituyente "Z," definido como la combinación de un CPP y un conector. El conector actúa como puente entre el CPP en su extremo carboxi y el extremo 3' y/o el extremo 5' del oligonucleótido. En varias realizaciones, un oligonucleótido antisentido puede comprender solamente un CPP unido al extremo 3' del oligómero. En otras realizaciones, un oligonucleótido antisentido puede comprender solamente un CPP unido al extremo 5' del oligómero.

El conector dentro de Z puede comprender, por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

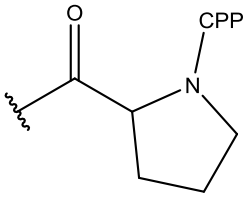
En realizaciones particulares, Z se selecciona entre:

$-C(O)(CH_2)_5NH$-CPP;

$-C(O)(CH_2)_2NH$-CPP;

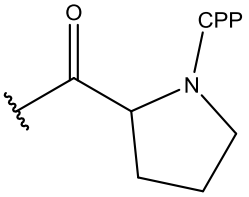
$-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH$-CPP;

$-C(O)CH_2NH$-CPP y la fórmula:



donde el CPP se une al resto conector mediante un enlace amida en el extremo carboxi de CPP.

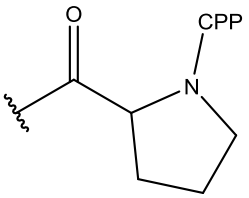
En varias realizaciones, el CPP es un péptido rico en arginina, tal como se describe en la presente y se observa en la Tabla 1. En determinadas realizaciones, el CPP rico en arginina es $-R_5-R^a$, (es decir, cinco residuos de arginina; SEQ ID NO: 21), donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo. En determinadas realizaciones, R^a es acetilo. En varias realizaciones, el CPP se selecciona entre las SEQ ID NO: 15, 16 o 21, y el conector se selecciona del grupo constituido por $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$,

$-C(O)CH_2NH-$ y 

. En algunas realizaciones, el conector comprende 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 21 y el conector es Gly. En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 20.

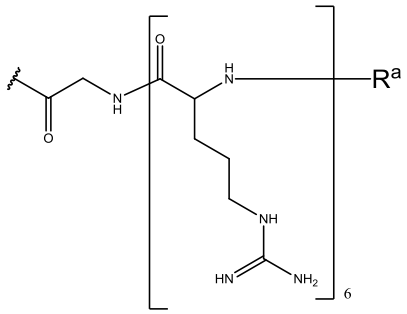
En determinadas realizaciones, el CPP rico en arginina es $-R_6-R^a$, (es decir, seis residuos de arginina; SEQ ID NO: 10), donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo. En determinadas realizaciones, R^a es acetilo. En varias realizaciones, el CPP se selecciona entre las SEQ ID NO: 10, 15 o 16, y el conector se selecciona del grupo constituido por $-C(O)(CH_2)_5NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NH-$, $-C(O)(CH_2)_2NHC(O)(CH_2)_5NH-$,

$-C(O)CH_2NH-$ y 

. En algunas realizaciones, el conector comprende 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos.

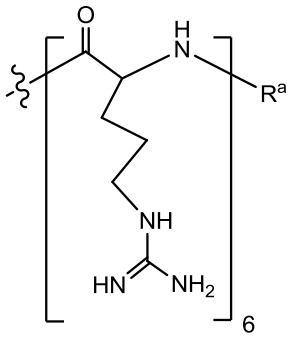
En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 10 y el conector es Gly. En algunas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 11.

En determinadas realizaciones, Z es -C(O)CH_2NH-R_6-R^a ("R_6" se divulga como la SEQ ID NO: 10) unida covalentemente a un oligómero antisentido de la divulgación en el extremo 5' y/o 3' del oligómero, donde R^a es H, acilo, acetilo, benzoílo o estearoílo para rematar el extremo amino del R_6 (SEQ ID NO: 10). En determinadas realizaciones, R^a es acetilo. En estos ejemplos no limitantes, el CPP es –R_6-R^a (SEQ ID NO: 10) y el conector es -C(O)CH_2NH-, (es decir, GLY). Este ejemplo particular de Z = -C(O)CH_2NH-R_6-R^a ("R_6" se divulga como la SEQ ID NO: 10) también se ilustra con la siguiente estructura:



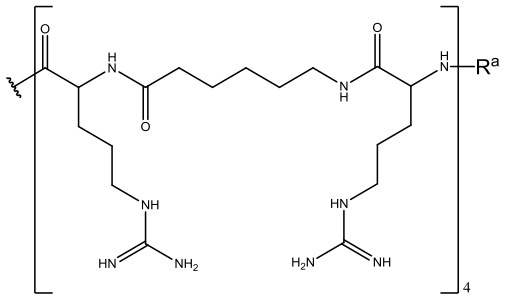
donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo.

En varias realizaciones, el CPP es -R_6-R^a (SEQ ID NO: 10), también se ilustra como la siguiente fórmula:



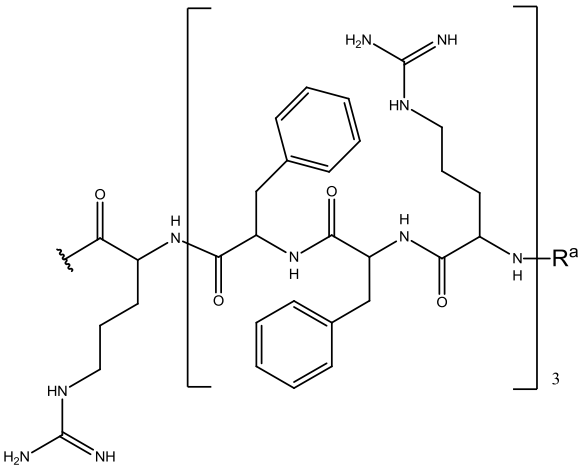
donde R^a se selecciona entre H, acilo, acetilo, benzoílo y estearoílo. En determinadas realizaciones, el CPP es la SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, R^a es acetilo.

En algunas realizaciones, el CPP es –$(RXR)_4$-R^a (SEQ ID NO: 15), también se ilustra como la siguiente fórmula:



.

En varias realizaciones, el CPP es –R-(FFR)$_3$-R^a (SEQ ID NO: 16), también se ilustra como la siguiente fórmula:



.

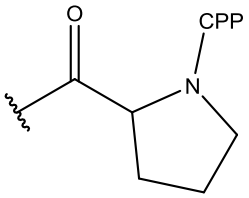
En varias realizaciones, Z se selecciona entre:

-C(O)(CH$_2$)$_5$NH-CPP;

-C(O)(CH$_2$)$_2$NH-CPP;

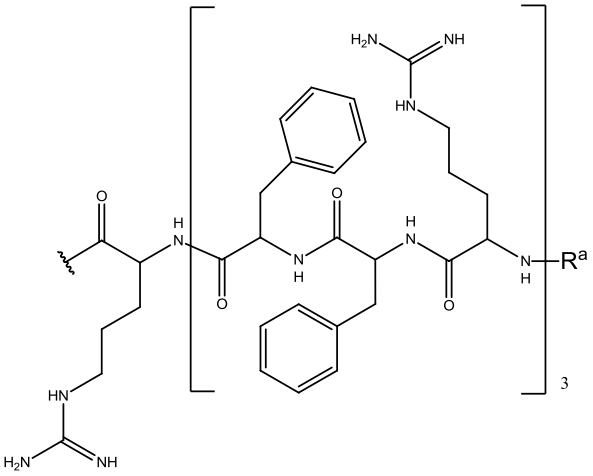
-C(O)(CH$_2$)$_2$NHC(O)(CH$_2$)$_5$NH-CPP;

-C(O)CH$_2$NH-CPP; y la fórmula:

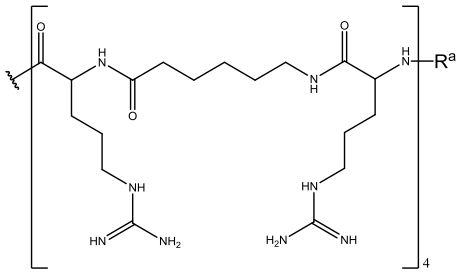


,

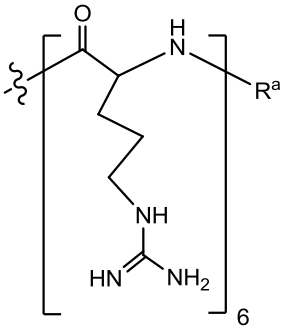
donde el CPP se une al resto conector mediante un enlace amida en el extremo carboxi del CPP, y donde el CPP se selecciona entre:



, (-R-(FFR)$_3$-R^a) (SEQ ID NO: 16),



, (-(RXR)$_4$-Rª) (SEQ ID NO: 15),



o (-R$_6$-Rª) (SEQ ID NO: 10). En algunas realizaciones, Rª es acetilo.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO. 3.

En algunos aspectos, las nucleobases del oligómero antisentido modificado se unen a estructuras de anillos morfolino, donde las estructuras de anillos morfolino se unen mediante enlaces intersubunidades que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una estructura de anillo a un carbono exocíclico 5’ de una estructura de anillo adyacente. En un aspecto de este tipo, T de cada una de las SEQ ID NO: 1-9 es preferentemente timina.

En algunos aspectos, las nucleobases del oligómero antisentido están unidas a un ácido peptidonucleico (APN), donde el esqueleto polinucleotídico de azúcares fosfato se reemplaza por un polímero pseudopeptídico flexible al cual se unen las nucleobases.

En algunos aspectos, la al menos una de las nucleobases del oligómero antisentido se une a ácido nucleico bloqueado (ANB), donde las estructuras de ácido nucleico bloqueado son análogos nucleotídicos que se modifican químicamente, donde el resto de ribosa tiene un puente extra que une el oxígeno 2’ y el carbono 4’. En un aspecto de este tipo, cada nucleobase que se une a un ANB en de cada una de las SEQ ID NO: 1-9 comprende un grupo 5-metilo.

En algunos aspectos, al menos una de las nucleobases del oligómero antisentido se une a un ácido nucleico con puente (BNA), donde la conformación del azúcar se restringe o se bloquea mediante la introducción de una estructura con puente adicional en el esqueleto de furanosa. En algunos aspectos, al menos una de las nucleobases del

oligómero antisentido se une a un ácido nucleico puenteado con 2'-O,4'-C-etileno (ANE). En dichos aspectos, cada nucleobase que se une a un BNA o ANE en de cada una de las SEQ ID NO: 1-9 comprende un grupo 5-metilo.

En algunos aspectos, cuando la química del esqueleto lo permite, cada timina en la SEQ ID NO: 1-9 es uracilo.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que sobreentenderían normalmente los expertos en la técnica a la cual pertenece la divulgación. Aunque se pueden utilizar cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente a la hora de llevar a la práctica o poner a prueba la presente divulgación, se describen los métodos y materiales preferidos. A efectos de la presente divulgación, se definen los siguientes términos a continuación.

I. Definiciones

El término “alquilo”, tal como se utiliza en la presente, a menos que se especifique de otro modo, se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado saturado. En determinadas realizaciones, el grupo alquilo es un hidrocarburo primario, secundario o terciario. En determinadas realizaciones, el grupo alquilo incluye de uno a diez átomos de carbono, es decir, alquilo de C_1 a $C_{10.}$ En determinadas realizaciones, el grupo alquilo incluye de uno a seis átomos de carbono, es decir, alquilo de C_1 a $C_{6.}$ El término incluye tanto grupos alquilo sustituidos como no sustituidos, que incluyen grupos alquilo halogenados. En determinadas realizaciones, el grupo alquilo es un grupo alquilo fluorinado. Los ejemplos no limitantes de restos con los cuales se puede sustituir el grupo alquilo se seleccionan del grupo constituido por halógeno (flúor, cloro, bromo o yodo), hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, sin proteger o protegido según proceda, conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Greene, *et al.*, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991, incorporada por la presente por referencia. En determinadas realizaciones, el grupo alquilo se selecciona del grupo constituido por metilo, CF_3, CCl_3, $CFCl_2$, CF_2Cl, etilo, CH_2CF_3, CF_2CF_3, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *t*-butilo, pentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-dimetilbutilo.

Se pretende que la expresión “susceptible de salto del exón 50”, tal como se utiliza en la presente en relación con un sujeto o un paciente, incluya sujetos y pacientes que tengan una o más mutaciones en el gen de distrofina que, estando ausente el salto

del exón 50 del preARNm de distrofina, provoca que el marco de lectura esté desfasado, con lo cual se altera la traducción del preARNm y da lugar a una incapacidad del sujeto o paciente para producir distrofina funcional o semifuncional. La determinación de si un paciente tiene una mutación en el gen de distrofina que es susceptible de salto de exones se encuentra dentro del alcance del experto en la técnica (remítase, por ejemplo, a Aartsma-Rus *et al.* (2009) *Hum Mutat.* 30:293-299; Gurvich *et al.*, *Hum Mutat.* 2009; 30(4) 633-640; y Fletcher *et al.* (2010) *Molecular Therapy* 18(6) 1218-1223.).

El término “oligómero”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una secuencia de subunidades unida por enlaces intersubunidades. En determinados casos, el término “oligómero” se utiliza en referencia a un “oligómero antisentido”. Para los “oligómeros antisentido”, cada subunidad está constituida por: (i) un azúcar de ribosa o un derivado de este; y (ii) una nucleobase unida a este, de modo que el orden de los restos de apareamiento de bases forma una secuencia de bases que es complementaria a una secuencia diana en un ácido nucleico (habitualmente un ARN) mediante apareamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia diana con la condición de que la subunidad, la unión intersubunidad, o ambas, no se encuentran presentes en la naturaleza. En determinadas realizaciones, el oligómero antisentido es un oligómero fosforodiamidato morfolino (PMO). En otras realizaciones, el oligómero antisentido es un 2'-O-metilfosforotioato. En otras realizaciones, el oligómero antisentido de la divulgación es un ácido peptidonucleico (APN), un ácido nucleico bloqueado (ANB) o un ácido nucleico con puente (BNA) tal como un ácido nucleico con un puente 2'-O,4'-C-etileno (ANE). En la presente se describen realizaciones ilustrativas adicionales.

Los términos “complementario” y “complementariedad” se refieren a dos o más oligómeros (es decir, que comprenden cada uno una secuencia de nucleobases) que se relacionan entre sí mediante las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia de nucleobases "T-G-A (5'→3')," es complementaria a la secuencia de nucleobases "A-C-T (3'→ 5')”. La complementariedad puede ser “parcial”, en la cual no todas las nucleobases de una secuencia de nucleobases determinada se aparean con la otra secuencia de nucleobases de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la complementariedad entre una secuencia de nucleobases determinada y la otra secuencia de nucleobases puede ser de aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 75 %, aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 % o aproximadamente un 95 %. O, puede haber una complementariedad “completa” o “perfecta” (100 %) entre

una secuencia de nucleobases determinada y la otra secuencia de nucleobases, para continuar el ejemplo. El grado de complementariedad entre las secuencias de nucleobases tienen efectos significativos sobre la eficiencia y la fuerza de hibridación entre las secuencias.

Las expresiones “cantidad eficaz” y “cantidad terapéuticamente eficaz” se utilizan de forma intercambiable en la presente y se refieren a una cantidad de compuesto terapéutico, tal como un oligómero antisentido administrado a un sujeto mamífero en forma de dosis únicas o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado. Para un oligómero antisentido, este efecto se consigue normalmente inhibiendo la traducción o el procesamiento de corte y empalme natural de una secuencia diana seleccionada, o produciendo una cantidad clínicamente significativa de distrofina (significación estadística).

En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido durante un periodo de tiempo para tratar al sujeto. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para aumentar el número de fibras positivas para distrofina en un sujeto. En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz es de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para estabilizar, mantener o mejorar la distancia de paseo, por ejemplo, en una prueba de 6 minutos caminando (6MWT), en un paciente respecto a un igual sano.

Los términos “mejorar” o “que mejora” o “aumentar” o “que aumenta” o “estimular” o “que estimula” se refieren generalmente a la capacidad de uno o más oligómeros antisentido o composiciones farmacéuticas de cualquiera de los anteriores para producir o causar una respuesta fisiológica mayor (es decir, efectos posteriores) en una célula o un sujeto, en comparación con la respuesta causada por un oligómero que no es antisentido o un compuesto de control. Una respuesta fisiológica mayor puede incluir una expresión mayor de una forma funcional de una proteína de distrofina o una actividad biológica mayor relacionada con la distrofina en tejido muscular, entre otras respuestas claras a partir de la comprensión de la técnica y la descripción de la presente.

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

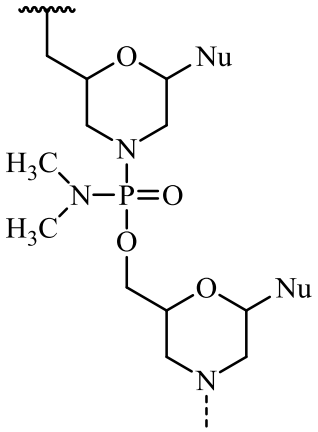
Una proteína de distrofina “funcional” se refiere generalmente a una proteína de distrofina que tiene una actividad biológica suficiente para reducir la degradación

progresiva del tejido muscular que es por lo demás característica de la distrofia muscular, habitualmente en comparación con la forma alterada o “defectuosa” de la proteína de distrofina que se encuentra presente en determinados sujetos con DMD o BMD. Como ejemplo, la actividad relacionada con la distrofina en cultivos de músculo *in vitro* se puede medir de acuerdo con el tamaño de los miotubos, la organización (o desorganización) miofibrilar, actividad contráctil y el agrupamiento espontáneo de receptores de acetilcolina (remítase, por ejemplo, a Brown *et al., Journal of Cell Science*. 112:209-216, 1999). Los modelos animales también son fuentes valiosas para estudiar la patogénesis de la enfermedad y proporcionar un medio para evaluar la actividad relacionada con la distrofina. Dos de los modelos animales más ampliamente utilizados para la investigación de la DMD son el ratón mdx y el perro con distrofia muscular golden retriever (GRMD), ambos de los cuales son negativas para distrofina (remítase, por ejemplo, a Collins & Morgan, *Int J Exp Pathol* 84: 165-172, 2003). Se pueden utilizar estos y otros modelos animales para medir la actividad funcional de varias proteínas de distrofina. Se incluyen formas truncadas de distrofina tales como aquellas formas que se producen después de la administración de determinados oligómeros antisentido de salto de exones de la presente divulgación.

Las expresiones “apareamiento incorrecto” o “apareamientos incorrectos” se refieren a una o más nucleobases (ya sean contiguas o separadas) en una secuencia de nucleobases oligomérica que no están apareadas con un preARNm diana de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. Aunque a menudo se desea una complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más, pero preferentemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 apareamientos incorrectos con respecto al preARNm diana. Se incluyen variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En determinadas realizaciones, los oligómeros antisentido de la divulgación incluyen variaciones en la secuencia de nucleobases próximas a los extremos, variaciones en el interior, y si se encuentran presentes, están habitualmente en aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 subunidades del extremo 5' y/o 3’. En determinadas realizaciones, se pueden eliminar una, dos o tres nucleobases y proporcionar aún una unión correcta.

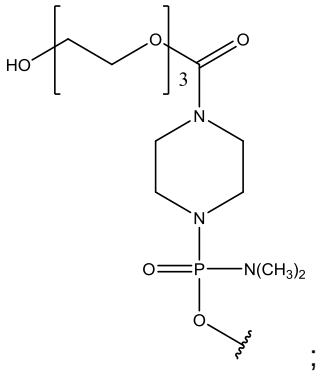
Los términos y expresiones “morfolino”, “oligómero morfolino” y “PMO” se

refieren a un oligómero fosforodiamidato morfolino de la siguiente estructura general:

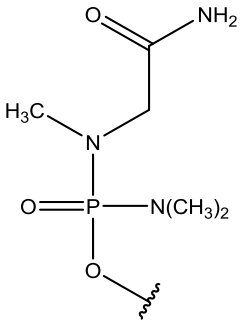


y como se describe en la Figura 2 de Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Los morfolinos descritos en la presente incluyen todos los estereoisómeros y tautómeros de la estructura general anterior. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las Patentes de EE. UU. N.os: 5 698 685; 5 217 866; 5 142 047; 5 034 506; 5 166 315; 5 521 063; 5 506 337; 8 076 476; y 8 299 206; todas las cuales se incorporan a la presente por referencia.

En determinadas realizaciones, un morfolino se conjuga en el extremo 5' o 3' del oligómero con un resto "cola" para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas ilustrativas incluyen:



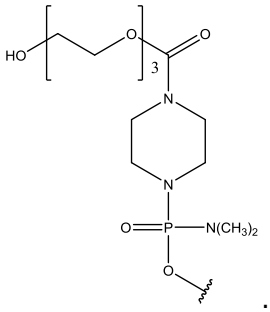
;



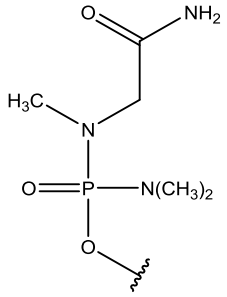
y

. El –OH o –NH_2 distal del resto T está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

De los restos de cola ilustrativos anteriores, "TEG" o "EG3" se refiere al siguiente resto de cola:

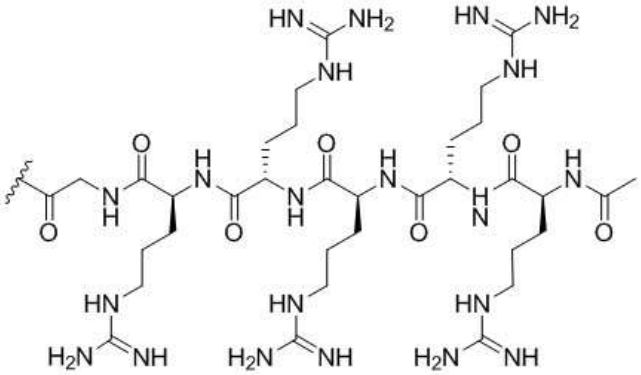


De los restos de cola ilustrativos anteriores, “GT” se refiere al siguiente resto de cola:

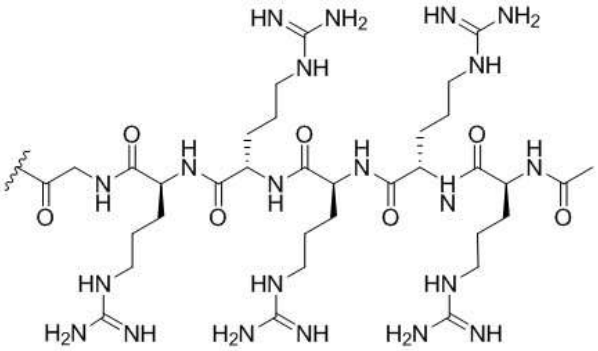


Tal como se utilizan en la presente, las expresiones "-G-R_5 (SEQ ID NO: 20)" y "-G-R_5-Ac (SEQ ID NO: 20)" se utilizan de forma intercambiable y se refieren a un resto peptídico conjugado con un oligómero antisentido de la divulgación. En varias realizaciones, “G” representa un residuo de glicina conjugado con "R_5 (SEQ ID NO: 21)" mediante un enlace amida, y cada "R" representa un residuo de arginina conjugados entre sí mediante enlaces amida de modo que "R_5 (SEQ ID NO: 21)" se refiere a cinco (5) residuos de arginina conjugados entre sí mediante enlaces amida. Los residuos de arginina pueden tener cualquier configuración estereoquímica, por ejemplo, los residuos de arginina pueden ser residuos de L-arginina, residuos de D-arginina o una mezcla de residuos de D- y L-arginina. En determinadas realizaciones, "-G-R_5 (SEQ ID NO: 20)" o "-G-R_5-Ac (SEQ ID NO: 20)" está unido al –OH o NH_2 distal del resto de “cola”. En determinadas realizaciones, "-G-R_5 (SEQ ID NO: 20)" o "-G-R_5-Ac (SEQ ID NO: 20)" se conjuga con el nitrógeno del anillo morfolino de la subunidad morfolino más en 3’ de un oligómero antisentido PMO de la divulgación. En algunas realizaciones, "-G-R_5 (SEQ ID

NO: 20)" o "-G-R_5-Ac (SEQ ID NO: 20)" se conjuga con el extremo 3' de un oligómero antisentido de la divulgación y tiene la siguiente fórmula:



, o una sal farmacéuticamente aceptable de este o

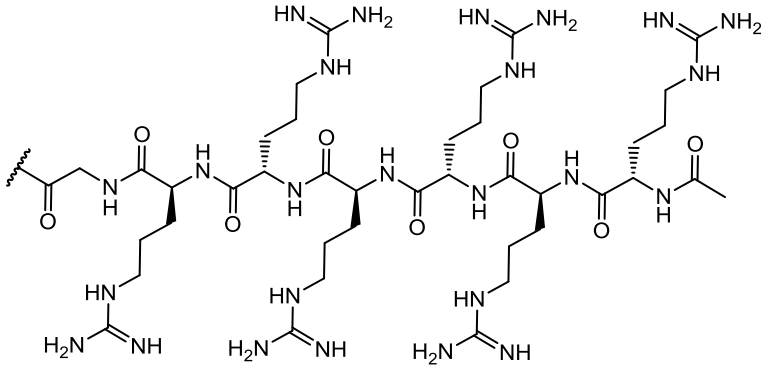


• 5HCl

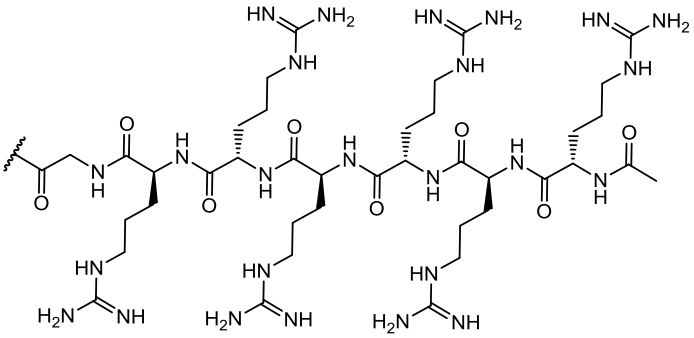
.

Tal como se utilizan en la presente, las expresiones "-G-R_6 (SEQ ID NO: 11)" y "-G-R_6-Ac (SEQ ID NO: 11)" y "R_6G (SEQ ID NO: 11)" se utilizan de forma intercambiable y se refieren a un resto peptídico conjugado con un oligómero antisentido de la divulgación. En varias realizaciones, "G" representa un residuo de glicina conjugado con "R_6 (SEQ ID NO: 10)" mediante un enlace amida, y cada "R" representa un residuo de arginina conjugados entre sí mediante enlaces amida de modo que "R_6 (SEQ ID NO: 10)" se refiere a seis (6) residuos de arginina conjugados entre sí mediante enlaces amida. Los residuos de arginina pueden tener cualquier configuración estereoquímica, por ejemplo, los residuos de arginina pueden ser residuos de L-arginina, residuos de D-arginina o una mezcla de residuos de D- y L-arginina. En determinadas realizaciones, "-G-R_6 (SEQ ID NO: 11)" o "-G-R_6-Ac (SEQ ID NO: 11)" está unido al –OH o –NH_2 distal del resto de "cola". En determinadas realizaciones, "-G-R_6 (SEQ ID NO: 11)" o "-G-R_6-Ac (SEQ ID NO: 11)" se conjuga con el nitrógeno del anillo morfolino de la subunidad morfolino más en 3' de un oligómero antisentido PMO de la divulgación. En algunas

realizaciones, "-G-R_6 (SEQ ID NO: 11)" o "-G-R_6-Ac (SEQ ID NO: 11)" se conjuga con el extremo 3' de un oligómero antisentido de la divulgación y tiene la siguiente fórmula:



o



.6HCl

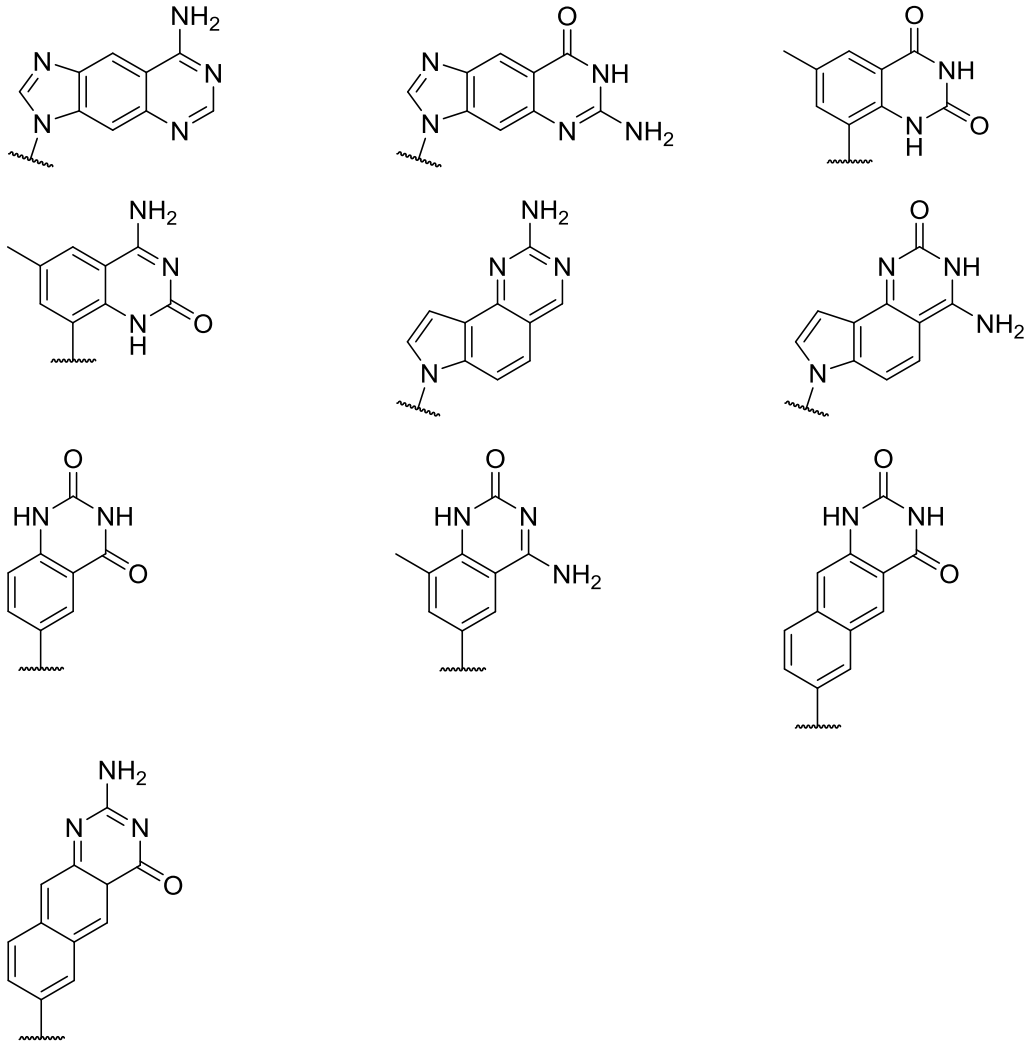
.

Los términos y expresiones "nucleobase" (Nu), "resto de apareamiento de bases" o "base" se utilizan de forma intercambiable para referirse a una base de purina o pirimidina que se encuentra en ADN o ARN presente en la naturaleza o "nativo" (por ejemplo, uracilo, timina, adenina, citosina y guanina), así como análogos de estas purinas y piridiminas presentes en la naturaleza. Estos análogos pueden conferir propiedades mejoradas al oligómero tales como afinidad de unión. Los análogos ilustrativos incluyen hipoxantina (el componente básico de la inosina); 2,6-diaminopurina; 5-metilcitosina; pirimidinas modificadas con C5-propinilo; 10-(9-(aminoetoxi)fenoxazinilo) (abrazadera en forma de G) y similares.

Algunos ejemplos adicionales de restos de apareamiento de bases incluyen, sin carácter limitante, uracilo, timina, adenina, citosina, guanina e hipoxantina (inosina) que tienen sus respectivos grupos amino protegidos por grupos protectores acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de pirimidina tales como pseudoisocitosina y pseudouracilo y otras nucleobases modificadas tales como purinas sustituidas en 8, xantina o hipoxantina (siendo las dos últimas los productos de degradación naturales). Las nucleobases modificadas divulgadas en: Chiu y Rana, *RNA*, 2003, 9, 1034-1048; Limbach *et al*. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22, 2183-2196; y Revankar y Rao,

Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313; también se contemplan, cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia.

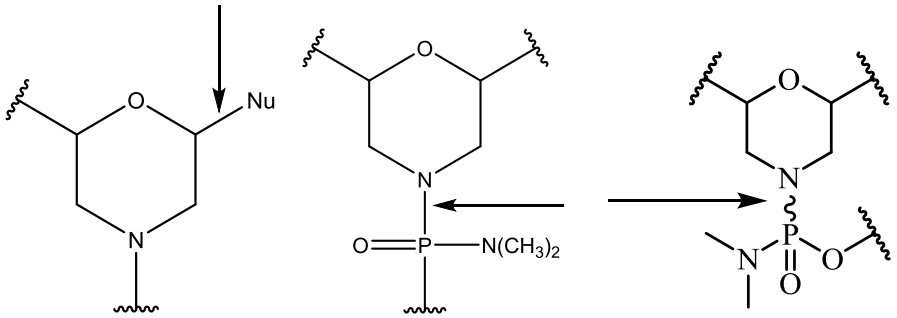
Algunos ejemplos de restos de apareamiento de bases adicionales incluyen, sin carácter limitante, nucleobases de tamaño expandido en las que se han añadido uno o más anillos de benceno. Las sustituciones de bases de ácidos nucleicos descritas en: el catálogo de Glen Research (www.glenresearch.com); Krueger AT *et al*., *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 141-150; Kool, ET, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 936-943; Benner S.A., *et al*., *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., *et al*., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7, 723-733; e Hirao, I., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 622-627; cuyo contenido se incorpora a la presente por referencia, se contemplan como útiles en los oligómeros antisentido descritos en la presente. Los ejemplos de nucleobases de tamaño expandido incluyen los que se muestran a continuación, así como formas tautoméricas de estas.



Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral”, tal como se utilizan en la presente se refieren a modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Tal como se utiliza en la presente, un conjunto de paréntesis utilizado dentro de una fórmula estructural indica que el rasgo estructural entre paréntesis se repite. En algunas realizaciones, los paréntesis utilizados pueden ser “[“ y ”]”, y en determinadas realizaciones, los paréntesis utilizados para indicar rasgos estructurales que se repiten pueden ser “(“ y ”)”. En algunas realizaciones, el número de iteraciones de repetición del rasgo estructural entre paréntesis es el número indicado fuera de los paréntesis tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7 y así sucesivamente. En varias realizaciones, el número de iteraciones de repetición del rasgo estructural entre paréntesis se indica con una variable indicada fuera de los paréntesis tal como “Z”.

Tal como se utiliza en la presente, un enlace recto o un enlace ondulado dibujado hacia un átomo de carbono o fósforo quiral dentro de una fórmula estructural indica que la estereoquímica del carbono o el fósforo quiral no está definida y se pretende que incluya todas las formas del centro quiral y/o mezclas de estas. Algunos ejemplos de dichas ilustraciones se representan a continuación.



La frase “farmacéuticamente aceptable” se refiere a que la sustancia o composición debe ser compatible, desde un punto de vista químico y/o toxicológico, con los demás ingredientes que comprende una formulación y/o el sujeto que está siendo tratado con ella.

La frase “portador farmacéuticamente aceptable”, tal como se utiliza en la presente, se refiere a un relleno, diluyente, material encapsulante o adyuvante de formulación de cualquier tipo líquido, semisólido o sólido inerte y atóxico. Algunos

ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables son: azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; lubricantes compatibles atóxicos tales como laurilsulfato sódico y estearato magnésico; agentes colorantes; agentes de liberación; agentes de recubrimiento; agentes edulcorantes; agentes saborizantes, agentes aromatizantes; conservantes; y antioxidantes; según el criterio del formulador.

El término “restauración” en relación con la síntesis o producción de distrofina se refiere por lo general a la producción de una proteína de distrofina que incluye formas truncadas de distrofina en un paciente con distrofia muscular después del tratamiento con un oligómero antisentido descrito en la presente. El porcentaje de fibras positivas para distrofina en un paciente después del tratamiento se puede determinar mediante una biopsia muscular utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede realizar una biopsia muscular de un músculo adecuado tal como el músculo bíceps braquial en un paciente.

El análisis del porcentaje de fibras positivas para distrofina se puede llevar a cabo antes del tratamiento y/o después del tratamiento o en momentos a lo largo de la duración del tratamiento. En algunas realizaciones, una biopsia posterior al tratamiento se realiza en el músculo contralateral de la biopsia anterior al tratamiento. El análisis de la expresión de la distrofina anterior y posterior al tratamiento se puede llevar a cabo utilizando cualquier ensayo adecuado para la distrofina. En algunas realizaciones, la detección inmunohistoquímica se lleva a cabo en secciones de tejido de la biopsia muscular utilizando un anticuerpo que es un marcador para la distrofina tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal. Por ejemplo, se puede utilizar el anticuerpo MANDYS106, que es un marcador muy sensible para la distrofina. Se puede utilizar cualquier anticuerpo secundario adecuado.

En algunas realizaciones, el porcentaje de fibras positivas para distrofina se calcula dividiendo el número de fibras positivas por el número total de fibras contado.

Las muestras musculares normales tienen un 100 % de fibras positivas para distrofina. Por lo tanto, el porcentaje de fibras positivas para distrofina se puede expresar como porcentaje del normal. Para controlar la presencia de niveles traza de distrofina en el músculo antes del tratamiento, así como fibras revertientes, se puede fijar un valor basal utilizando secciones de músculos antes del tratamiento de un paciente cuando se cuentan las fibras positivas para distrofina en los músculos después del tratamiento. Esto se puede utilizar como un umbral para contar fibras positivas para distrofina en secciones de músculos después del tratamiento en ese paciente. En otras realizaciones, también se pueden utilizar secciones de tejido teñidas con anticuerpos para la cuantificación de la distrofina utilizando el software de análisis de imagen Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). La intensidad de la señal de fluorescencia de distrofina total se puede indicar como un porcentaje del normal. Además, el análisis de inmunotransferencia de Western con anticuerpos antidistrofina monoclonales o policlonales se puede utilizar para determinar el porcentaje de fibras positivas para distrofina. Por ejemplo, se puede utilizar el anticuerpo antidistrofina NCL-Dys1 de Leica Biosystems. También se puede analizar el porcentaje de fibras positivas para distrofina determinando la expresión de los componentes del complejo de sarcoglicanos (β,γ) y/o NOS neuronales.

En algunas realizaciones, el tratamiento con un oligómero antisentido de la divulgación ralentiza o reduce la disfunción y/o fallo progresivos de los músculos respiratorios que se esperaría en pacientes con DMD sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento con un oligómero antisentido de la divulgación puede reducir o eliminar la necesidad de asistencia de ventilación que se esperaría sin tratamiento. En algunas realizaciones, las medidas de la función respiratoria para seguir la evolución de la enfermedad, así como la evaluación de las intervenciones terapéuticas potenciales, incluyen la presión de inspiración máxima (PIM), presión de espiración máxima (PEM) y capacidad vital forzada (CVF). La PIM y la PEM miden el nivel de presión que una persona puede generar durante la inhalación y la exhalación, respectivamente, y son medidas sensibles de fuerza muscular respiratoria. La PIM es una medida de la debilidad muscular del diafragma.

En algunas realizaciones, la PEM puede reducirse antes de que se produzcan cambios en otras pruebas de la función pulmonar, que incluyen PIM y CVF. En determinadas realizaciones, la PEM puede ser un indicador temprano de la disfunción respiratoria. En determinadas realizaciones, la CVF se puede utilizar para medir el volumen total de aire exhalado durante la exhalación forzada después de la inspiración

máxima. En pacientes con DMD, la CVF aumenta de forma simultánea con el crecimiento físico hasta los primeros años de la adolescencia. Sin embargo, a medida que el crecimiento se ralentiza o se atrofia por la progresión de la enfermedad, y la debilidad muscular progresa, la capacidad vital entra en una fase descendente y se reduce a una velocidad promedio de aproximadamente un 8 a un 8,5 por ciento por año después de 10 a 12 años de edad. En determinadas realizaciones, el porcentaje de PIM predicho (PIM ajustado para el peso), el porcentaje de PEM predicho (PEM ajustado para la edad) y porcentaje de CVF predicho (CVF ajustado para la edad y la altura) son análisis de apoyo.

Los términos “sujeto” y “paciente”, tal como se utilizan en la presente, incluyen cualquier animal que presenta un síntoma o se encuentra en riesgo de presentar un síntoma, que se puede tratar con un oligómero antisentido de la divulgación tal como un sujeto (o paciente) que tiene o se encuentra en riesgo de tener DMD o BMD, o cualquiera de los síntomas asociados con estas afecciones (por ejemplo, pérdida de fibras musculares). Los sujetos (o pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cerdo de guinea), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como un gato o perro). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes (o sujetos) humanos. También se incluyen métodos para producir distrofina en un sujeto (o paciente) que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50.

Las frases “administración sistémica”, “administrado sistémicamente”, “administración periférica” y “administrado periféricamente”, tal como se utilizan en la presente, se refieren a la administración de un compuesto, fármaco u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de modo que entra en el sistema del paciente y, por tanto, está sujeto al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

La frase “secuencia dirigida” o “secuencia de bases” se refiere a una secuencia de nucleobases de un oligómero que es complementario a una secuencia de nucleótidos en un preARNm diana. En algunas realizaciones de la divulgación, la secuencia de nucleótidos en el preARNm diana es un sitio de hibridación del exón 50, intrón 49 y/o intrón 50 en el preARNm de distrofina diseñado como H50D(+04-18), H50D(+07-18), H50D(+07-16), H50D(+07-17), H50A(-19+07), H50D(+07-15), H50A(-02+23), H50D(+06-18) o H50D(+07-20). En una realización, el sitio de hibridación utilizado como diana por el oligómero antisentido descrito en la presente es H50D(+07-16).

El “tratamiento” de un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano)

o una célula es cualquier tipo de intervención utilizado en un intento de alterar el curso natural del sujeto o célula. El tratamiento incluye, sin carácter limitante, la administración de un oligómero o una composición farmacéutica de este, y se puede llevar a cabo de forma profiláctica o posterior al inicio de un evento patológico o al contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección asociada con la proteína de distrofina, como en determinadas formas de distrofia muscular y puede incluir, por ejemplo, cambios o mejoras mínimos en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se está tratando. También se incluyen tratamientos "profilácticos", que se pueden dirigir a reducir la tasa de progresión de la enfermedad o afección que se está tratando, lo que retrasa la aparición de esa enfermedad o afección, o reduce la gravedad de su aparición. El término "tratamiento" o "profilaxis" no indica necesariamente erradicación, cura o prevención completa de la enfermedad o afección, o de los síntomas asociados con ella.

En algunas realizaciones, el tratamiento con un oligómero antisentido de la divulgación aumenta la producción de distrofina novedosa, retrasa la progresión de la enfermedad, ralentiza o reduce la pérdida de ambulación, reduce la inflamación muscular, reduce el daño muscular, mejora la función muscular, reduce la pérdida de función pulmonar y/o mejora la regeneración muscular que se esperaría sin tratamiento. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene, retrasa o ralentiza la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene la ambulación o reduce la pérdida de ambulación. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene la función pulmonar o reduce la pérdida de función pulmonar. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de paseo estable en un paciente, como se mide, por ejemplo, con la prueba de 6 minutos caminando (6MWT). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para caminar/correr 10 metros (es decir, la prueba de caminar/correr 10 metros). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para llegar a la posición erguida desde posición supina (es decir, tiempo para llegar a la posición erguida). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para subir cuatro escalones estándar (es decir, prueba para subir cuatro escalones). En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o reduce la inflamación muscular en el paciente, tal como se mide, por ejemplo, con RMI (por ejemplo, RMI de los músculos de la pierna). En algunas realizaciones, RMI mide el T2 y/o la fracción de grasa para identificar la degeneración muscular. La RMI puede identificar cambios en la estructura y composición muscular provocados por inflamación, edema, daño muscular e infiltración de grasa.

En algunas realizaciones, el tratamiento con un oligómero antisentido de la divulgación aumenta la producción de distrofina novedosa y ralentiza o reduce la pérdida de ambulación que se esperaría sin tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede estabilizar, mantener, mejorar o aumentar la capacidad para caminar (por ejemplo, estabilización de la ambulación) en el sujeto. En algunas realizaciones, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de paseo estable en un paciente, medida, por ejemplo, mediante la prueba de 6 minutos caminando (6MWT), descrita por McDonald, *et al.* (*Muscle Nerve*, 2010; 42:966-74, incorporado a la presente por referencia). Un cambio en la distancia de 6 minutos caminando (6MWD) se puede expresar como un valor absoluto, un cambio porcentual o un cambio en el valor de % predicho. El desempeño de un paciente con DMD en la 6MWT respecto al desempeño habitual de un igual sano se puede determinar calculando un valor de % predicho. Por ejemplo, el % predicho de 6MWD se puede calcular utilizando la siguiente ecuación para los hombres: 196,72 + (39,81 x edad) – (1,36 x edad^2) + (132,28 x altura en metros). Para las mujeres, el % predicho de 6MWD se puede calcular utilizando la siguiente ecuación: 188,61 + (51,50 x edad) – (1,86 x edad^2) + (86,10 x altura en metros) (Henricson *et al. PLoS Curr.*, 2012, versión 2, incorporado a la presente por referencia).

Puede tener lugar una pérdida de función muscular en pacientes con DMD frente a los antecedentes de crecimiento y desarrollo infantil normales. De hecho, los niños más jóvenes con DMD pueden mostrar un aumento en la distancia caminada durante el 6MWT durante el transcurso de aproximadamente 1 año a pesar del deterioro muscular progresivo. En algunas realizaciones, la 6MWD de los pacientes con DMD se compara con sujetos de control con un desarrollo habitual y con datos normativos existentes de sujetos con edad y sexo equiparados. En algunas realizaciones, se puede contabilizar el crecimiento y desarrollo normal utilizando una ecuación basada en la edad y la altura ajustada a los datos normativos. Dicha ecuación se puede utilizar para convertir 6MWD en un valor de porcentaje predicho (% predicho) en sujetos con DMD. En determinadas realizaciones, el análisis de los datos de % de 6MWD predicho representa un método para contabilizar el crecimiento y desarrollo normales, y puede mostrar que los progresos en la función a edades tempranas (por ejemplo, menores o iguales a una edad de 7) representan capacidades que son estables en lugar de mejoradas en pacientes con DMD (Henricson *et al. PLoS Curr.*, 2012, versión 2, incorporado a la presente por referencia).

Se propuso y se publicó un sistema de nomenclatura de moléculas antisentido para distinguir entre las diferentes moléculas antisentido (remítase a Mann *et al.*, (2002)

J Gen Med 4, 644-654). Esta nomenclatura se volvió especialmente relevante al evaluar varias moléculas antisentido ligeramente diferentes, todas dirigidas a la misma región diana, tal como se muestra a continuación:

H#A/D(x:y).

La primera letra designa la especie (por ejemplo, H: humana, M: murina, C: canina). "#" designa el número de exón de distrofina diana. "A/D" indica el sitio de corte y empalme dador o aceptor al comienzo y al final del exón, respectivamente. (x y) representa las coordenadas de hibridación en las que "-" o "+" indican secuencias intrónicas o exónicas, respectivamente. Por ejemplo, A(-6+18) indicaría las últimas 6 bases del intrón que precede al exón diana y las primeras 18 bases del exón diana. El sitio de corte y empalme más próximo sería el aceptor, de modo que estas coordenadas estarían precedidas por una "A". Las coordenadas de hibridación descriptoras en el sitio de corte y empalme dador podría ser D(+2-18), en las que las 2 últimas bases exónicas y las 18 primeras bases intrónicas corresponden al sitio de hibridación de la molécula antisentido. Las coordenadas de hibridación totalmente exónicas que estarían representadas por A(+65+85), que es el sitio entre el 65.º y el 85.º nucleótido del inicio de ese exón.

II. <u>Oligómeros antisentido</u>

A. Oligómeros antisentido diseñados para inducir el salto del exón 50

En determinadas realizaciones, los oligómeros antisentido de la divulgación son complementarios a una región diana del exón 50, intrón 49 y/o intrón 50 del gen de distrofina e inducen salto del exón 50. En particular, la divulgación se refiere a oligómeros antisentido complementarios a una región diana del exón 50, intrón 49 y/o intrón 50 del preARNm de distrofina designado como sitio de hibridación. En algunas realizaciones, el sitio de hibridación se selecciona entre H50D(+04-18), H50D(+07-18), H50D(+07-16), H50D(+07-17), H50A(-19+07), H50D(+07-15), H50A(-02+23), H50D(+06-18) o H50D(+07-20). En algunas realizaciones, el sitio de hibridación es H50D(+07-16).

Los oligómeros antisentido de la divulgación tienen como diana el preARNm de distrofina e inducen salto del exón 50, de modo que se salta o se excluye del transcrito de ARNm cortado y empalmado maduro. Al saltar el exón 50, el marco de lectura alterado se restablece como una mutación dentro del marco. Aunque la DMD comprende varios subtipos genéticos, los oligómeros antisentido de la divulgación se diseñaron específicamente para saltar el exón 50 del preARNm de distrofina. Las

mutaciones de DMD susceptibles de salto del exón 50 comprenden un subgrupo de pacientes con DMD (4 %).

La secuencia de nucleobases de un oligómero antisentido que induce salto del exón 50 se diseña para que sea complementaria a una secuencia diana específica dentro del exón 50, intrón 49 y/o intrón 50 del preARNm de distrofina. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido es un PMO en el que cada anillo de morfolino del PMO está unido a una nucleobase que incluye, por ejemplo, las nucleobases que se encuentran en el ADN (adenina, citosina, guanina y timina).

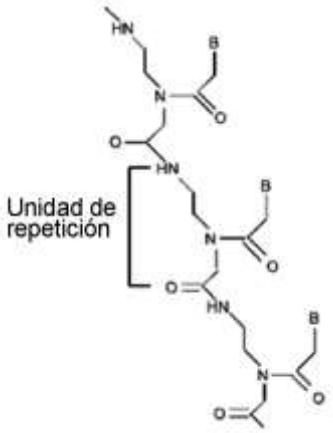
B. Características químicas de los oligómeros

Los oligómeros antisentido de la divulgación pueden emplear una serie de químicas de oligómeros antisentido. Los ejemplos de químicas de oligómeros incluyen, sin limitación, oligómeros morfolino, oligómeros modificados con fosforotioato, oligómeros con modificación 2'-O-metilo, ácido peptidonucleico (APN), ácido nucleico bloqueado (ANB), oligómeros de fosforotioato, oligómeros con modificación 2'-O-MOE, oligómero con modificación 2' fluoro, ácidos nucleicos con puente de 2'O,4'C-etileno (ANE), triciclo-ADN, subunidades fosforotioato de triciclo-ADN, oligómeros con modificación 2'-O-[2-(N-metilcarbamoil)etilo], que incluyen combinaciones de cualquiera de los anteriores. Se pueden combinar las químicas con modificación fosforotioato y 2'-O-Me para generar un esqueleto de 2'-O-Me-fosforotioato. Remítase, por ejemplo, a las Publicaciones PCT N.os WO/2013/112053 y WO/2009/008725, que se incorporan por la presente por referencia en su totalidad. Tal como permite la química utilizada, cada T en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-9 puede ser uracilo. Tal como permite la química utilizada, las nucleobases relevantes en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-9 pueden comprender un grupo 5-metilo. Las realizaciones ilustrativas de las químicas de los oligómeros de la divulgación se describen adicionalmente a continuación.

1. Ácidos peptidonucleicos (APN)

Los ácidos peptidonucleicos (APN) son análogos de ADN en los que el esqueleto es estructuralmente homomorfo con un esqueleto de desoxirribosa, constituido por unidades de N-(2-aminoetil)glicina a las que se unen bases de pirimidina o purina. Los APN que contienen bases de pirimidina y purina naturales se hibridan con oligómeros complementarios que obedecen a las reglas de apareamiento de bases de Watson-Crick, e imitan al ADN en cuanto al reconocimiento de pares de bases. El esqueleto de los APN está formado por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster, lo que los hace muy adecuados para aplicaciones antisentido (remítase a la estructura a continuación). El esqueleto no está cargado, lo cual da lugar a dúplex de APN/ADN o

APN/ARN que presentan una estabilidad térmica superior a la normal. Los APN no son reconocidos por las nucleasas ni las proteasas. Un ejemplo no limitante de APN se representa a continuación.



APN

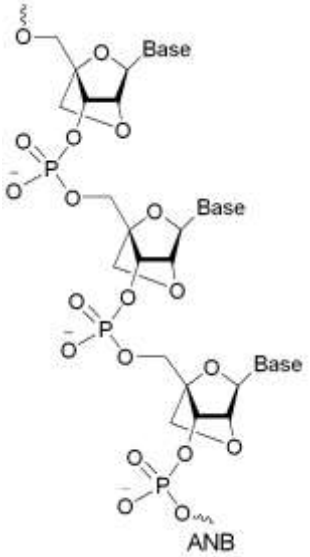
A pesar de un cambio estructural radical respecto a la estructura natural, los APN son capaces de unirse con especificidad de secuencia en forma de hélice al ADN o ARN. Las características de los APN incluyen una afinidad de unión elevada respecto a ADN o ARN complementario, un efecto desestabilizante causado por un apareamiento incorrecto de una sola base, resistencia a nucleasas y proteasas, hibridación con ADN o ARN independiente de la concentración de sales y formación de tríplex con ADN homopurínico. PANAGENE™ ha desarrollado sus monómeros de APN con Bts propios (Bts; grupo benzotiazol-2-sulfonilo) y un proceso de oligomerización propio. La oligomerización de APN utilizando monómeros de APN con Bts se compone de ciclos repetitivos de desprotección, acoplamiento y rematado. Los APN se pueden producir sintéticamente utilizando cualquier técnica conocida en la técnica. Remítase, por ejemplo, a las Pat. de EE. UU. N.os: 6 969 766; 7 211 668; 7 022 851; 7 125 994; 7 145 006 y 7 179 896. Remítase también a las Pat. de EE. UU. N.os: 5 539 082; 5 714 331 y 5 719 262 para la preparación de APN. Se puede encontrar más contenido sobre compuestos de APN en Nielsen *et al*., *Science*, 254:1497-1500, 1991. Cada uno de los anteriores se incorpora por referencia en su totalidad.

2. Ácidos nucleicos bloqueados (ANB)

Los oligómeros antisentido también pueden contener subunidades de “ácido nucleico bloqueado” (ANB). Los “ANB” son un miembro de una clase de modificaciones denominada ácido nucleico con puente (BNA). El BNA se caracteriza por un enlace covalente que bloquea la conformación del anillo de ribosa en un pliegue de azúcar C30-endo (northern). Para el ANB, el puente está constituido por un metileno entre las

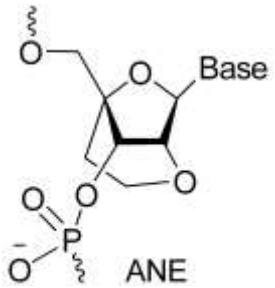
posiciones 2'-O y la 4'-C. El ANB mejora la preorganización del esqueleto y el apilamiento de bases para aumentar la hibridación y la estabilidad térmica.

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



Los oligómeros antisentido de la divulgación pueden incorporar uno o más ANB; en algunos casos, los oligómeros antisentido pueden estar constituidos completamente por ANB. Se describen métodos para la síntesis de subunidades de nucleósidos de ANB individuales y su incorporación en los oligómeros, por ejemplo, en las Pat. de EE. UU. N°s. 7 572 582; 7 569 575; 7 084 125; 7 060 809; 7 053 207; 7 034 133; 6 794 499 y 6 670 461; cada una de las cuales se incorpora por referencia en su totalidad. Los conectores intersubunidades habituales incluyen restos fosfodiéster y fosforotioato; como alternativa, se pueden emplear conectores que no contengan fósforo. Algunas realizaciones adicionales incluyen un ANB que contiene un oligómero antisentido donde cada subunidad de ANB está separada por una subunidad de ADN. Ciertos oligómeros antisentido se componen de subunidades de ANB y ADN alternas donde el conector intersubunidades es fosforotioato.

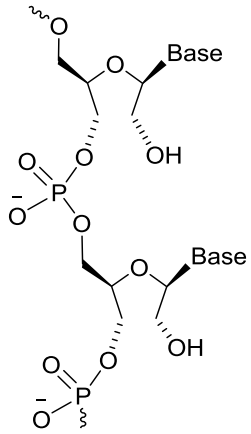
Los ácidos nucleicos con puente 2'O,4'C-etileno (ANE) son otro miembro de la clase de los BNA. Un ejemplo no limitante se representa a continuación.



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

3. Ácido nucleico desbloqueado (UNA)

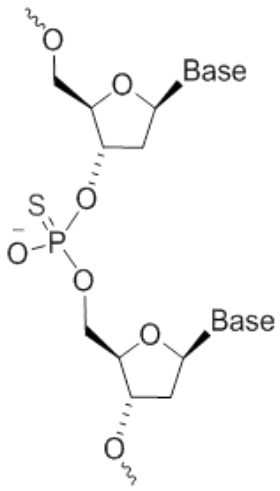
Los oligómeros antisentido también pueden contener subunidades de ácido nucleico desbloqueado (UNA). Los UNA y los oligómeros de UNA son un análogo de ARN en el que el enlace C2′-C3’ de la subunidad ha sido escindido. Mientras que el ANB está restringido desde el punto de vista conformacional (respecto al ADN y ARN), el UNA es muy flexible. Se divulgan UNA, por ejemplo, en el documento WO 2016/070166. Un ejemplo no limitante de un UNA se representa a continuación.



Los conectores intersubunidades habituales incluyen restos fosfodiéster y fosforotioato; como alternativa, se pueden emplear conectores que no contengan fósforo.

4. Fosforotioatos

Los “fosforotioatos” (o S-oligos) son una variante de ADN normal en la que uno de los oxígenos que no forman puentes se reemplaza por un azufre. Un ejemplo no limitante de un fosforotioato se representa a continuación.

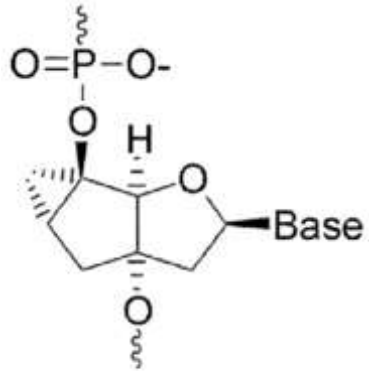


La sulfurización del enlace internucleótido reduce la acción de las endo- y exonucleasas que incluyen ADN POL 1 exonucleasa de 5’ a 3’ y de 3’ a 5’, nucleasas S1 y P1, RNasas, nucleasas séricas y fosfodiesterasa de veneno de serpiente. Los fosforotioatos se preparan por dos vías principales: mediante la acción de una solución de azufre elemental en disulfuro de carbono en un fosfonato de hidrógeno o mediante el método de sulfurizar triésteres de fosfito con disulfuro de tetraetiltiuram (TETD) o 1,1-dióxido de 3H-1,2-benzoditiol-3-ona (BDTD) (remítase, por ejemplo, a Iyer *et al*., *J. Org. Chem.* 55, 4693-4699, 1990, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad). Los últimos métodos evitan el problema de la insolubilidad del azufre elemental en la mayoría de disolventes orgánicos y la toxicidad del disulfuro de carbono. Los métodos con TETD y BDTD también proporcionan fosforotioatos de pureza más elevada.

5. Subunidades de triciclo-ADN y triciclo-fosforotioato

Los triciclo-ADN (tc-ADN) son una clase de análogos de ADN restringido en los cuales cada nucleótido se modifica mediante la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional del esqueleto y para optimizar la geometría del esqueleto del ángulo de torsión γ. Los tc-ADN que contienen adenina y timina homobásicos forman pares de bases A-T extraordinariamente estables con ARN complementarios. Se describen triciclo-ADN y su síntesis en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2010/115993, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Los oligómeros antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de triciclo-ADN; en algunos casos, los oligómeros antisentido pueden estar constituidos completamente por subunidades de triciclo-ADN.

Las subunidades de triciclo-fosforotioato son subunidades de triciclo-ADN con enlaces intersubunidades fosforotioato. Se describen subunidades de triciclo-fosforotioato y su síntesis en la Publicación de la Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2013/053928, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Los oligómeros antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de triciclo-ADN; en algunos casos, los oligómeros antisentido pueden estar constituidos completamente por subunidades de triciclo-ADN. Un ejemplo no limitante de una subunidad de triciclo-ADN/triciclo-fosforotioato se representa a continuación.

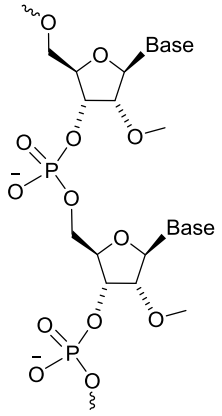


triciclo-ADN

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

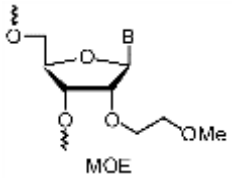
Las moléculas de “oligómero 2’-O-Me” portan un grupo metilo en el residuo 2’-OH de la molécula de ribosa. Los 2’-O-Me-ARN muestran el mismo comportamiento (o uno similar) que el ADN, pero están protegidos contra la degradación con nucleasas. También se pueden combinar 2’-O-Me-ARN con oligómeros fosforotioato (PTO) para una estabilización adicional. Los oligómeros 2’O-Me (fosfodiéster o fosforotioato) se pueden sintetizar de acuerdo con técnicas rutinarias de la técnica (remítase, por ejemplo, a Yoo *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 32:2008-16, 2004, que se incorpora por la

presente por referencia en su totalidad). Un ejemplo no limitante de un oligómero 2'O-Me se representa a continuación.

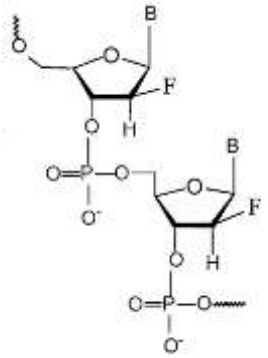


2'-O-Me

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



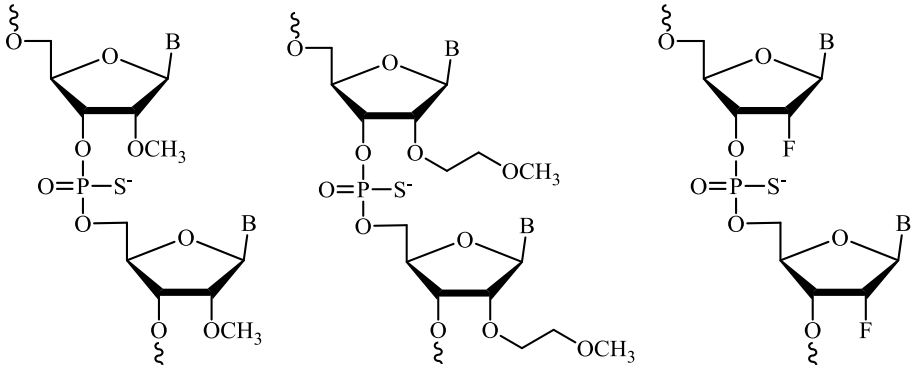
Los oligómeros 2'-Fluoro (2'-F) tienen un radical fluoro en la posición 2' en lugar del 2'-OH. Un ejemplo no limitante de un oligómero 2'-F se representa a continuación.



2'-F

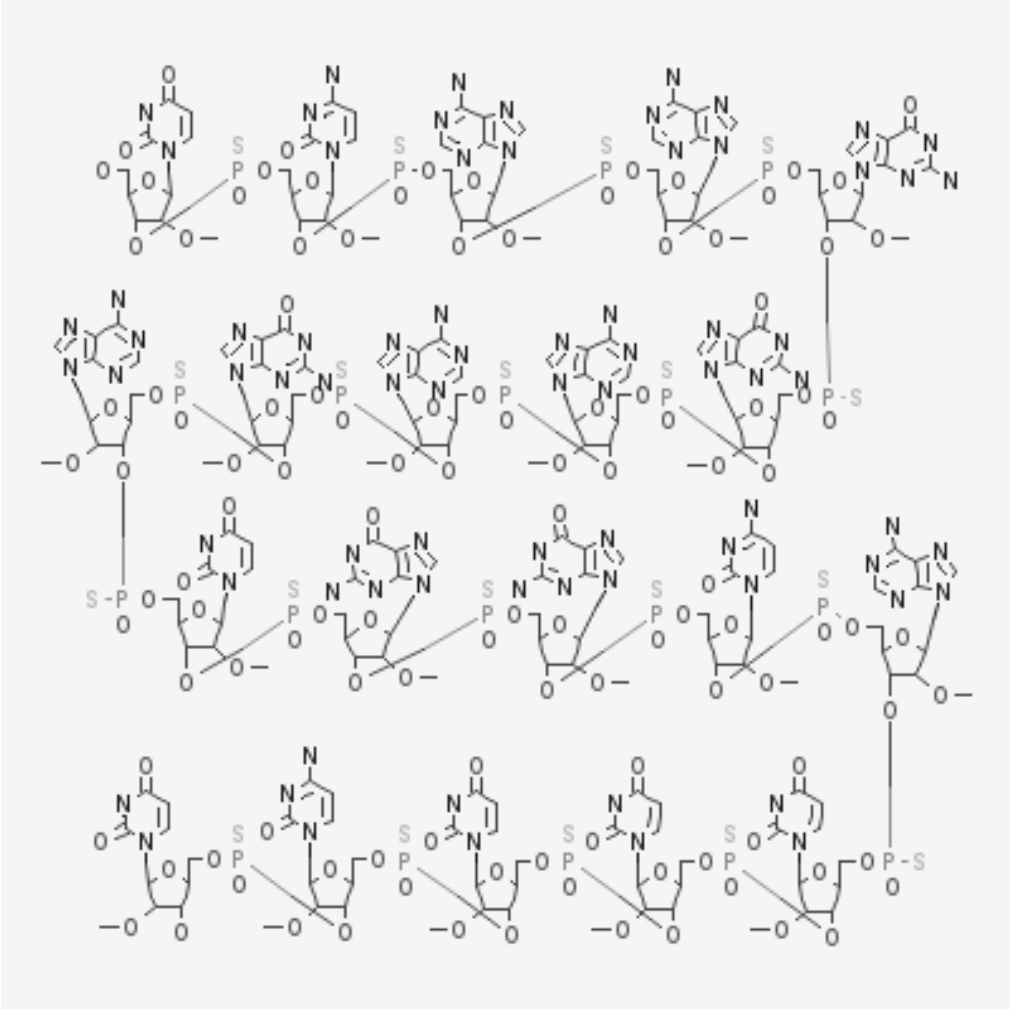
Se describen adicionalmente oligómeros 2'-fluoro en el documento WO 2004/043977, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

Oligómeros 2’-O-metilo, 2’-O-MOE y 2’-F pueden comprender también uno o más enlaces fosforotioato (PS), tal como se representa a continuación.

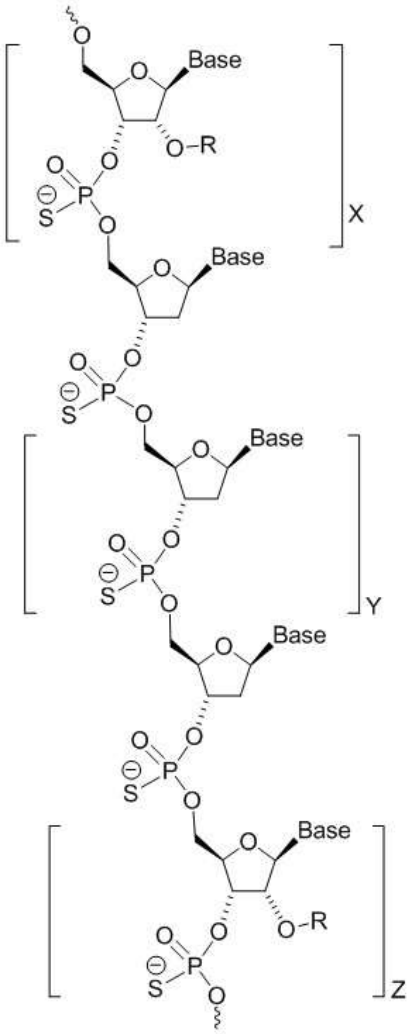


2'-O-Metilo PS 2'-O-MOE PS 2'-F PS

Además, los oligómeros 2'-O-metilo, 2'-O-MOE y 2'-F pueden comprender enlaces intersubunidades PS a lo largo de todo el oligómero, por ejemplo, como en el oligómero 2’-O-metilo PS drisapersen representado a continuación.



Como alternativa, los oligómeros 2’-O-metilo, 2’-O-MOE y/o 2’-F pueden comprender enlaces PS en los extremos del oligómero, tal como se representa a continuación.



donde:

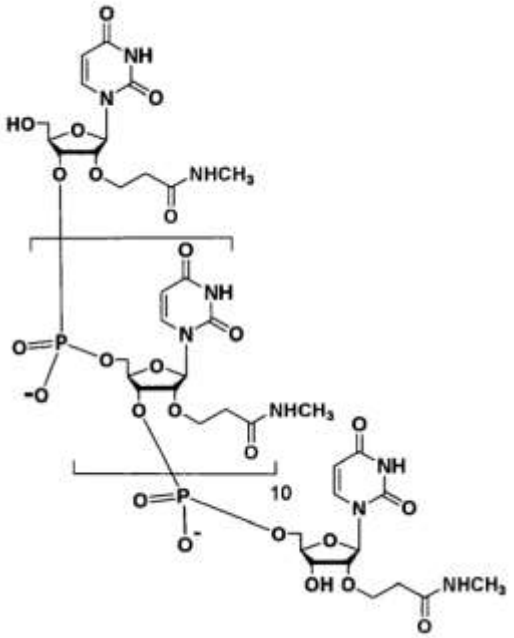
R es $CH_2CH_2OCH_3$ (metoxietilo o MOE); y

X, Y y Z denotan el número de nucleótidos contenidos dentro de cada una de las regiones designadas ala 5’, hueco central y ala 3’, respectivamente.

Los oligómeros antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades 2'-O-metilo, 2'-O-MOE y 2'-F y pueden utilizar cualquiera de los enlaces intersubunidades descritos en la presente. En algunos casos, un oligómero antisentido de la divulgación puede estar compuesto de subunidades completamente 2'-O-metilo, 2'-O-MOE o 2'-F. Una realización de un oligómero antisentido de la divulgación se compone enteramente de subunidades 2'-O-metilo.

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

Los MCE son otro ejemplo de ribonucleósidos con modificación 2’-O útiles en los oligómeros antisentido de la divulgación. En la presente, el 2’-OH se derivatiza a un resto 2-(N-metilcarbamoil)etilo para aumentar la resistencia de nucleasas. Un ejemplo no limitante de un oligómero MCE se representa a continuación.

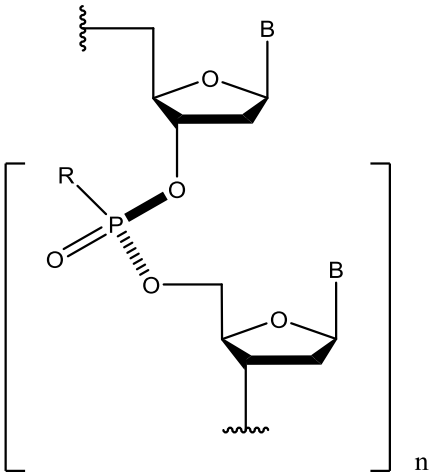


Los MCE y su síntesis se describen en Yamada *et al.*, *J. Org. Chem.* (2011) 76(9):3042-53, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad. Los oligómeros antisentido de la divulgación pueden incorporar una o más subunidades de MCE.

8. Oligómeros estereoespecíficos

Los oligómeros estereoespecíficos son aquellos en los que la estereoquímica de cada enlace que contiene fósforo es fijada por el método de síntesis, de modo que se

produce un oligómero en esencia estereoquímicamente puro. Un ejemplo no limitante de un oligómero estereoespecífico se representa a continuación.



En el ejemplo anterior, cada fósforo del oligómero tiene la misma configuración estereoquímica. Algunos ejemplos adicionales incluyen los oligómeros descritos en la presente. Por ejemplo, los oligómeros basados en ANB, ANE, triciclo-ADN, MCE, 2'-O-metilo, 2'-O-MOE, 2'F y morfolino se pueden preparar con enlaces internucleósidos que contienen fósforo estereoespecíficos tales como, por ejemplo, fosforotioato, fosfodiéster, fosforamidato, fosforodiamidato u otros enlaces internucleósidos que contienen fósforo. Los oligómeros estereoespecíficos, métodos de preparación, síntesis controlada quiral, diseño quiral y auxiliares quirales para su uso en la preparación de dichos oligómeros se detallan, por ejemplo, en los documentos WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858 y WO2011005761, cada uno de los cuales se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

Los oligómeros estereoespecíficos pueden tener enlaces internucleósidos que contienen fósforo en una configuración R_P o S_P. Los enlaces que contienen fósforos quirales en los que la configuración estereoquímica de los enlaces está controlada se denominan "estereoquímicamente puros", mientras que los enlaces que contienen fósforos quirales en los que la configuración estereoquímica de los enlaces no está controlada se denominan "estereoquímicamente aleatorios". En determinadas realizaciones, los oligómeros de la divulgación comprenden una pluralidad de enlaces estereoquímicamente puros y aleatorios, de modo que el oligómero resultante tiene subunidades estereoquímicamente puras en posiciones preespecficadas del oligómero.

Un ejemplo de la ubicación de las subunidades estereoquímicamente puras se proporciona en la publicación de solicitud de patente internacional número WO 2017/062862 A2 en las Figuras 7A y 7B. En una realización, todos los enlaces que contienen fósforos quirales en un oligómero son estereoquímicamente aleatorios. En una realización, todos los enlaces que contienen fósforos quirales en un oligómero son estereoquímicamente puros.

En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), los n enlaces que contienen fósforos quirales en el oligómero son estereoquímicamente aleatorios. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), los n enlaces que contienen fósforos quirales en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 10 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 20 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 30 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 40 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 50 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 60 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 70 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero

con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 80 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros. En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), al menos un 90 % (respecto al número entero más próximo) de los n enlaces que contienen fósforo en el oligómero son estereoquímicamente puros.

En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 2 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 3 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 4 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 5 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 6 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 7 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 8 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 9 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es

decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 10 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 11 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 12 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 13 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 14 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 15 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 16 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 17 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 18 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 19 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es

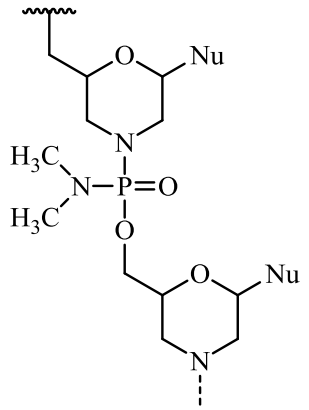
decir, S_P o R_P). En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 20 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P).

En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 2 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica (es decir, S_P o R_P) y al menos 2 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la otra orientación estereoquímica. Por ejemplo, el oligómero puede contener al menos 2 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la orientación S_P y al menos 2 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la orientación R_P.

En una realización de un oligómero con n enlaces que contienen fósforos quirales (donde n es un número entero de 1 o superior), el oligómero contiene al menos 2 enlaces que contienen fósforo estereoquímicamente puros contiguos de la misma orientación estereoquímica en un patrón alterno. Por ejemplo, el oligómero puede contener los siguientes en orden: 2 o más R_P, 2 o más S_P y 2 o más R_P, etc.

9. Oligómeros morfolino

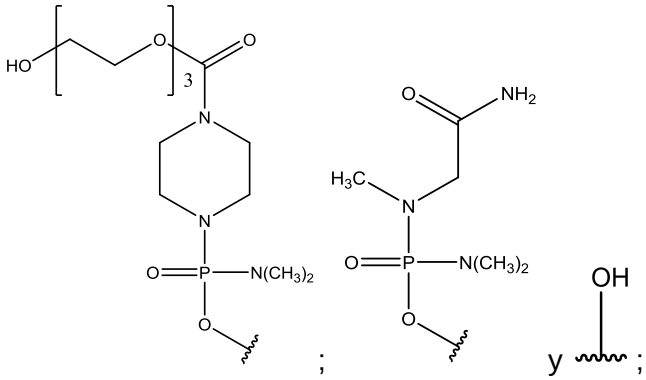
Las realizaciones ilustrativas de la divulgación se refieren a los oligómeros fosforodiamidato morfolino de la siguiente estructura general:



y como se describe en la Figura 2 de Summerton, J., *et al.*, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187-195 (1997). Se pretende que los morfolinos descritos en la presente incluyan todos los estereoisómeros y tautómeros de la estructura general anterior. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las Patentes de EE. UU. N.os: 5 698 685; 5 217 866; 5 142 047; 5 034 506; 5 166 315; 5 521 063; 5 506 337; 8 076 476; y 8 299 206, todas las cuales

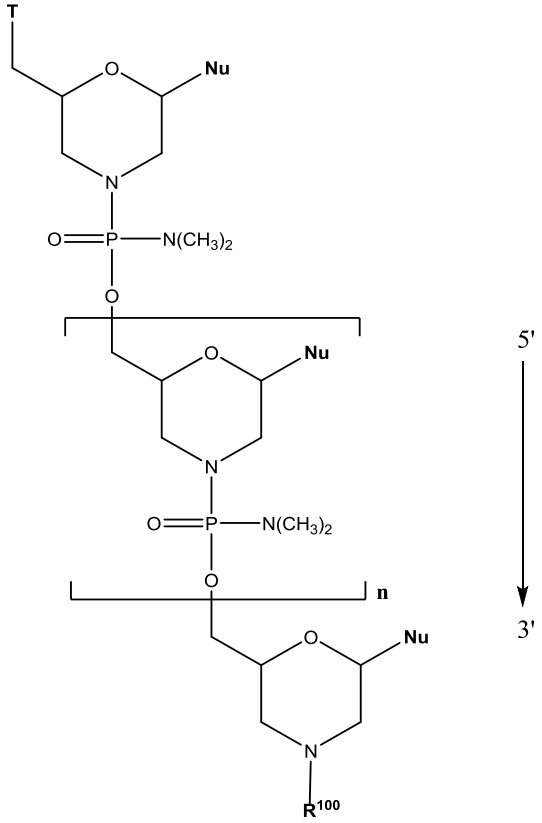
se incorporan a la presente por referencia.

En determinadas realizaciones, un morfolino se conjuga en el extremo 5’ o 3’ del oligómero con un resto “cola” para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. Las colas ilustrativas incluyen:



y el –OH o –NH_2 distal del resto “cola” está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

En varios aspectos, la divulgación proporciona oligómeros antisentido de acuerdo con la Fórmula (I):

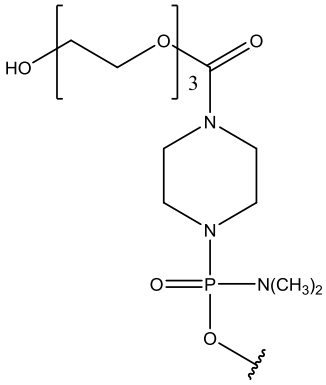


(I)

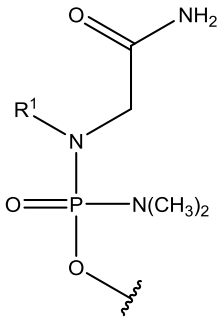
o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, donde:

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

T es un resto seleccionado entre:



;



; y

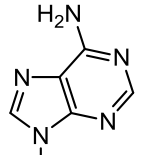
; y el –OH o –NH_2 distal del resto T está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células;

R^{100} es hidrógeno o un péptido que penetra en las células;

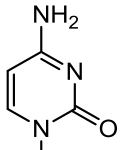
cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

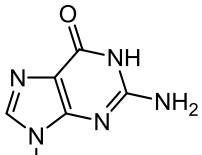
donde A es



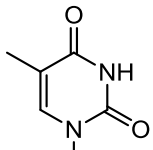
, C es



, G es

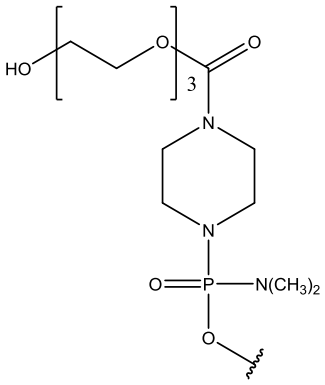


y T es



.

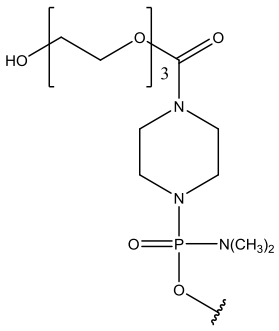
En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a una de las siguientes: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a la SEQ ID NO. 3.

En varias realizaciones, T es 

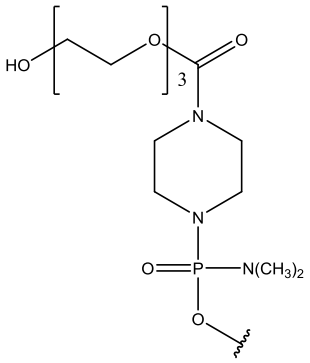
; y el –OH distal del resto T está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

En varias realizaciones, R^{100} es hidrógeno. En varias realizaciones más, R^{100} es un péptido que penetra en las células. En varias realizaciones, R^{100} es $–R^5$ (SEQ ID NO: 21). En varias realizaciones, R^{100} es $-G-R^5$ (SEQ ID NO: 20). En varias realizaciones, R^{100} es $–R^6$ (SEQ ID NO: 10). En varias realizaciones diferentes, R^{100} es $-G-R^6$ (SEQ ID NO: 11).

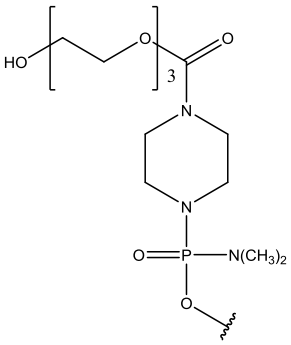
En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (I) se encuentra en su forma de base libre. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (I) es una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (I) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) de este. En determinadas realizaciones, la sal de HCl es una sal 1HCl, 2HCl, 3HCl, 4HCl, 5HCl o 6HCl. En determinadas realizaciones, la sal de HCl es una sal 6HCl.

En varias realizaciones, T es 

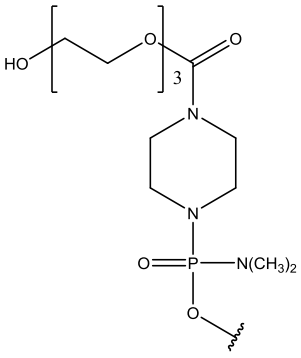
; y el –OH distal del resto T está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células, y R^{100} es un péptido que penetra en las células.

En varias realizaciones, T es 

, y R^{100} es un péptido que penetra en las células.

En varias realizaciones, T es 

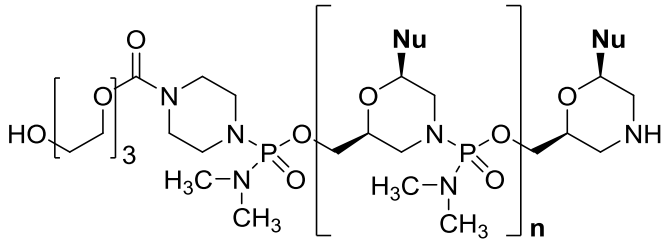
, y R^{100} es -G-R^5 (SEQ ID NO: 20).

En varias realizaciones, T es 

, y R^{100} es -G-R^6 (SEQ ID NO: 11).

En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de la divulgación es acorde a la Fórmula (II):

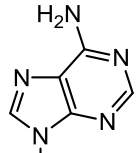
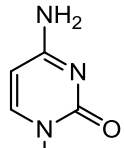
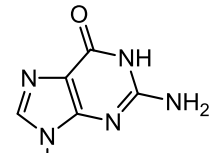
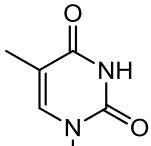
[5'] [3']



(II)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

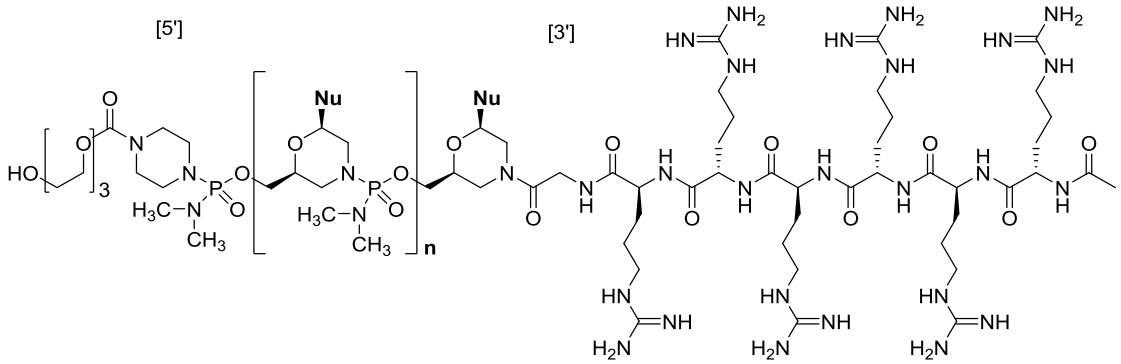
donde A es  , C es  , G es  y T es  . En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (II) se une a un péptido que penetra en las células.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a una de las siguientes: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a la SEQ ID NO. 3.

En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (II) se encuentra en su forma de base libre. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (II) una forma de sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (II) es una sal de HCl (ácido

clorhídrico) de este. En determinadas realizaciones, la sal de HCl es una sal 1HCl, 2HCl, 3HCl, 4HCl, 5HCl o 6HCl. En determinadas realizaciones, la sal de HCl es una sal 6HCl.

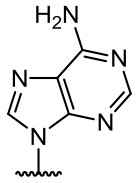
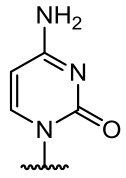
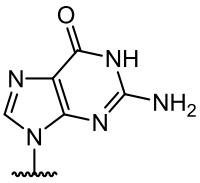
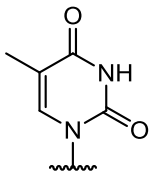
En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de la divulgación es acorde a la Fórmula (III):



(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

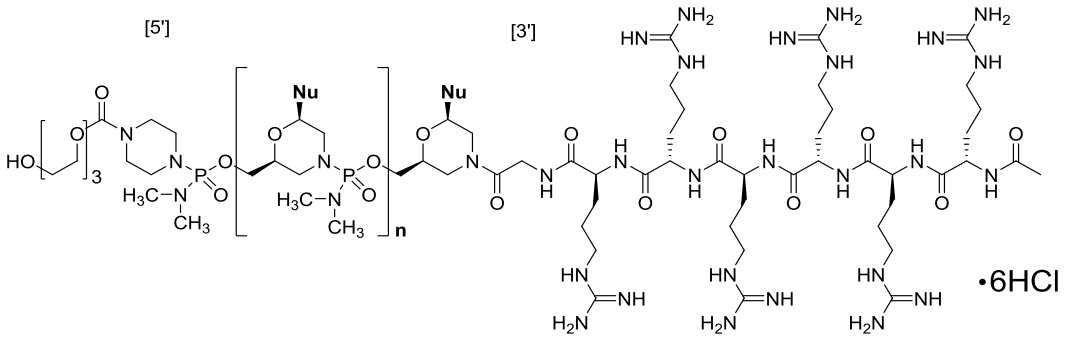
donde A es  , C es  , G es  y T es  . En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (III) se une a un péptido que penetra en las células.

En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (III) se une opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a una de las siguientes: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO. 3.

En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (III) se encuentra en forma de base libre. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (III) es una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (III) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) de este. En determinadas realizaciones, la sal de HCl es una sal 6HCl.

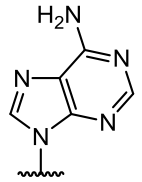
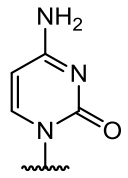
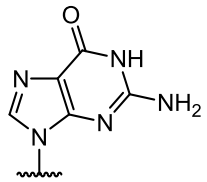
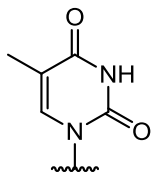
En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de la divulgación es acorde a la Fórmula (IV):



(IV)

donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

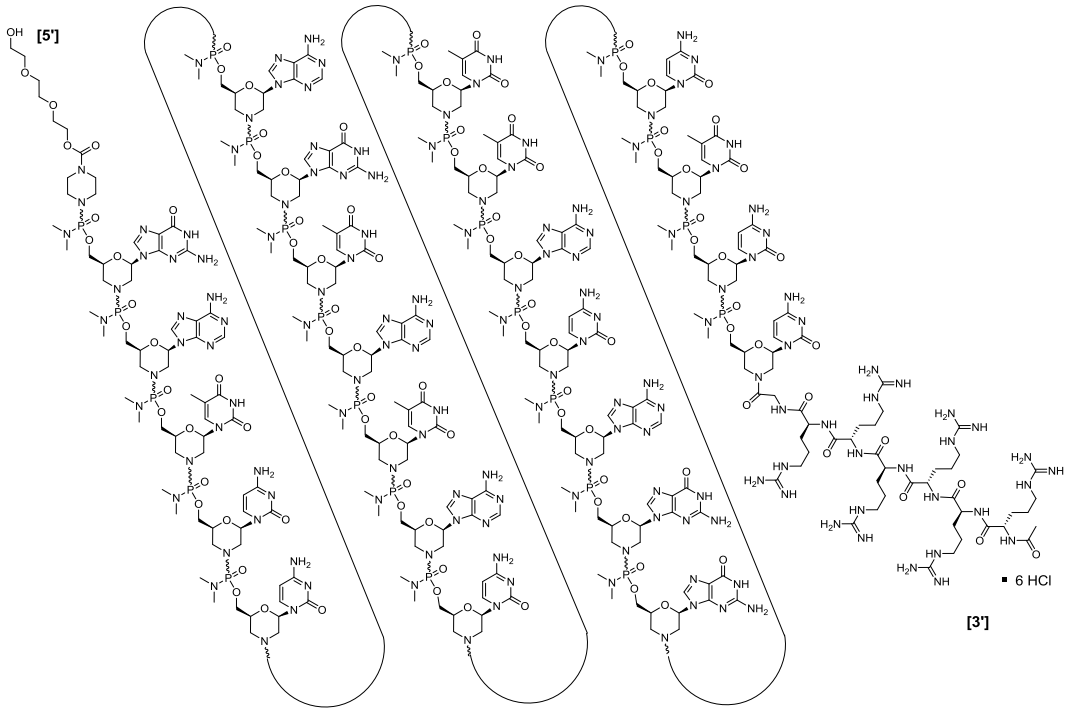
Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5’ a 3’]**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

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

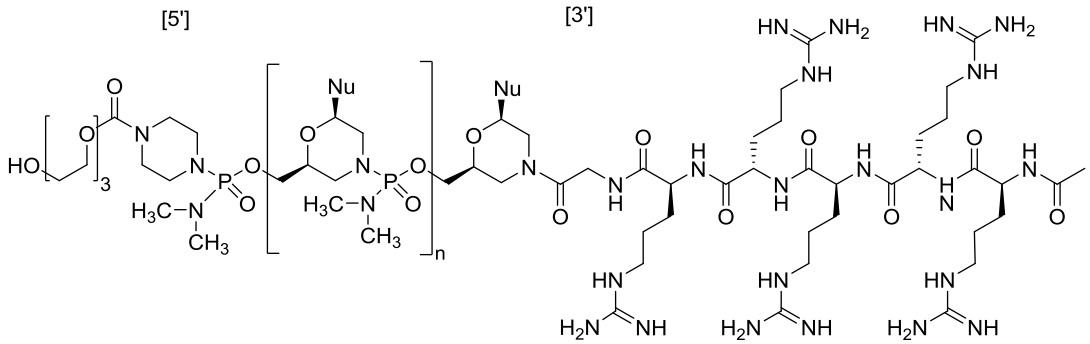
En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (IV) se une opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a una de las siguientes: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO. 3.

En algunas realizaciones, que incluyen, por ejemplo, algunas realizaciones de Fórmula (IV), el oligómero antisentido es acorde a la Fórmula (IVa):



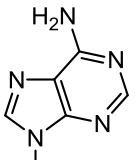
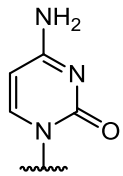
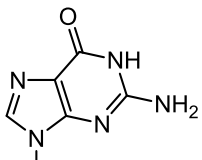
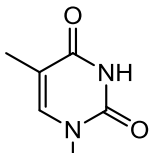
En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de la divulgación es acorde a la Fórmula (V):



(V)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde A es  , C es  , G es  y T es  . En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (IV) se une a un péptido que penetra en las células.

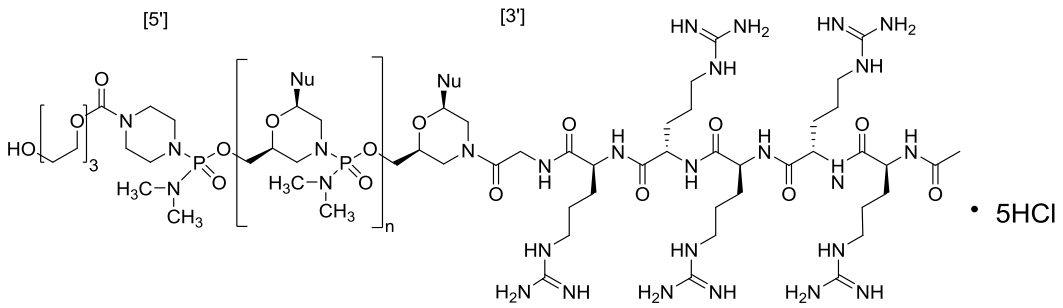
En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (V) se une opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a una de las siguientes: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID

NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO. 3.

En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (V) se encuentra en forma de base libre. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (V) es una sal farmacéuticamente aceptable de este. En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de Fórmula (V) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) de este. En determinadas realizaciones, la sal de HCl es una sal 5HCl.

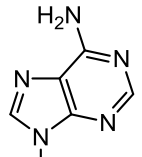
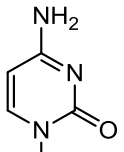
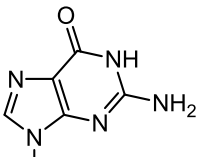
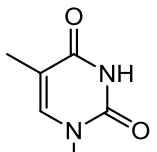
En algunas realizaciones, un oligómero antisentido de la divulgación es acorde a la Fórmula (VI):



(VI)

donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5’ a 3’]**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

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

En algunas realizaciones, el –OH distal de la Fórmula (VI) se une opcionalmente a un péptido que penetra en las células.

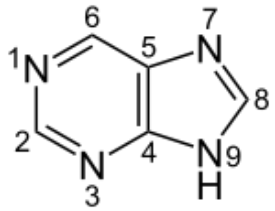
En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a una de las siguientes: SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3, SEQ ID NO. 4, SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6, SEQ ID NO. 7, SEQ ID NO. 8 o SEQ ID NO. 9. En algunas realizaciones, cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO. 3.

10. Modificaciones y sustituciones de nucleobases

En determinadas realizaciones, los oligómeros antisentido de la divulgación se componen de nucleobases de ARN y nucleobases de ADN (a menudo denominadas en la técnica simplemente como “base”). Las bases de ARN se conocen comúnmente como adenina (A), uracilo (U), citosina (C) y guanina (G). Las bases de ADN se conocen comúnmente como adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). En varias realizaciones, los oligómeros antisentido de la divulgación se componen de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracilo (U) e hipoxantina (I).

En determinadas realizaciones, se pueden modificar o sustituir una o más bases de ARN o bases de ADN en un oligómero con una base que no sea una base de ARN o una base de ADN. Los oligómeros que contienen una base modificada o sustituida incluyen oligómeros en los que una o más de las bases de purina o pirimidina encontradas más comúnmente en los ácidos nucleicos se reemplazan por bases menos comunes o artificiales.

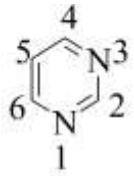
Las bases de purina comprenden un anillo de pirimidina fusionado con un anillo de imidazol, tal como se describe mediante la siguiente fórmula general.



Purina

La adenina y la guanina son las dos nucleobases de purina que se encuentran más habitualmente en los ácidos nucleicos. Otras purinas naturales incluyen, sin carácter limitante, N^6-metiladenina, N^2-metilguanina, hipoxantina y 7-metilguanina.

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



Núcleo de pirimidina

La citosina, el uracilo y la timina son las bases de pirimidina que se encuentran más habitualmente en los ácidos nucleicos. Otras pirimidinas naturales incluyen, sin carácter limitante, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, pseudouracilo y 4-tiouracilo. En una realización, los oligómeros descritos en la presente contienen bases de timina en lugar de uracilo.

Otras bases adecuadas incluyen, sin carácter limitante: 2,6-diaminopurina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidinas (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), abrazadera en forma de G y sus derivados, pirimidinas sustituidas en posición 5 (por ejemplo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Súper T), 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-desazaguanina, 8-aza-7-desazaadenina, 8-aza-7-desaza-2,6-diaminopurina, Súper G, Súper A y N4-etilcitosina o derivados de estas; N^2-ciclopentilguanina (cPent-G), N^2-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) y N^2-propil-2-aminopurina (Pr-AP), pseudouracilo, o derivados de estas; y bases universales o degeneradas, como 2,6-difluorotolueno o bases ausentes como sitios abásicos (por ejemplo, 1-desoxirribosa 1,2-didesoxirribosa, l-desoxi-2-O-metilribosa; o derivados de pirrolidina en los que el oxígeno del anillo ha sido reemplazado con nitrógeno (azarribosa)). Se pueden encontrar ejemplos de derivados de Súper A, Súper G y Súper T en la Patente de EE. UU. 6 683 173 (Epoch Biosciences), que se incorpora a la presente en su totalidad por referencia. Se mostró que cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducían los efectos inmunoestimuladores cuando se incorporaban en un ARNpi (Peacock H. *et al.*, *J. Am. Chem.* Soc. 2011, 133, 9200). El pseudouracilo es una versión isomerizada natural del uracilo, con un C-glucósido en lugar del N-glucósido normal como en la uridina. El ARNm sintético que contiene pseudouridina puede tener un perfil de seguridad mejorado en comparación con un mPvNa que contiene uridina (documento WO 2009127230, incorporado a la presente en su totalidad por referencia).

Determinadas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los oligómeros antisentido de la divulgación. Estas incluyen pirimidinas sustituidas en posición 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones con 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 ºC y son actualmente sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcares 2'-O-metoxietilo. Algunas nucleobases modificadas ilustrativas adicionales incluyen aquellas en las que se reemplaza al menos un átomo de hidrógeno de la nucleobase con flúor.

11. Sales farmacéuticamente aceptables de oligómeros antisentido

Determinadas realizaciones de los oligómeros antisentido descritos en la presente pueden contener un grupo funcional básico tal como amino o alquilamino y son, por tanto, capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables”, a este respecto, se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos atóxicas de los oligómeros antisentido de la presente divulgación. Estas sales se pueden preparar *in situ* en el proceso de fabricación del vehículo de administración o de la forma farmacéutica, o haciendo reaccionar por separado un oligómero antisentido purificado de la divulgación en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislar la sal así formada durante la purificación posterior. Las sales representativas incluyen las sales de bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares. (Remítase, por ejemplo, a Berge *et al*. (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci*. 66:1-19).

Las sales farmacéuticamente aceptables de los oligómeros antisentido objeto incluyen las sales atóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los oligómeros antisentido, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos atóxicos. Por ejemplo, dichas sales atóxicas convencionales incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotiónico y similares.

En determinadas realizaciones, los oligómeros antisentido de la presente divulgación pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” en estos casos se refiere a las sales de adición de bases inorgánicas y orgánicas relativamente atóxicas de los oligómeros antisentido de la presente divulgación. Estas sales se pueden preparar a su vez *in situ* en el proceso de fabricación del vehículo de administración o de la forma farmacéutica, o haciendo reaccionar por separado el oligómero antisentido purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares. (Remítase, por ejemplo, a Berge *et al*., *supra*).

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

En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona formulaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para el suministro terapéutico de oligómeros antisentido, tal como se describe en la presente. Por tanto, en determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los oligómeros antisentido descritos en la presente, formulados junto con uno o más portadores (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Aunque es posible que un oligómero antisentido de la presente divulgación se administre solo, es preferible administrar el oligómero antisentido como una formulación (composición) farmacéutica. En una realización, el oligómero antisentido de la formulación es acorde a la Fórmula (III) o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

Algunos métodos para el suministro de moléculas de ácido nucleico, que se pueden aplicar a los oligómeros antisentido de la presente divulgación, se describen, por ejemplo, en: Akhtar *et al*., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2:139; *Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; y Sullivan *et al*., PCT WO 94/02595. Estos y otros protocolos se pueden utilizar para el suministro de virtualmente cualquier molécula de ácido nucleico, incluidos los oligómeros antisentido de la presente divulgación.

Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden formular especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluidas las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, soluciones orales (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos (dirigidos a la absorción bucal, sublingual o sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural, en forma, por ejemplo, de una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, en forma de crema, pomada, o un parche de liberación controlada o aerosol aplicado a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarectal, por ejemplo, en forma de pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; u (8) por vía nasal.

Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; (9) aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles tales como propilenglicol; (11) polioles tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponantes tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua exenta de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas con pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles atóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

Algunos ejemplos no limitantes adicionales de agentes adecuados para su formulación con los oligómeros antisentido de la presente divulgación incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG; ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos; ácidos nucleicos que contienen restos lipófilos; fosforotioatos; inhibidores de P-glicoproteínas (tales como Pluronic P85) que pueden mejorar la entrada de fármacos en varios tejidos; polímeros biodegradables tales como microesferas de poli(D,L-lactida-coglicolida) para un suministro de liberación sostenida después de la implantación (Emerich, D F *et al*., 1999, *Cell Transplant,* 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas tales como las compuestas por policianoacrilato de butilo, que pueden

suministrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal (*Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 23, 941-949, 1999).

La divulgación también presenta el uso de la composición que comprende liposomas con modificaciones superficiales que contienen lípidos de polietilenglicol ("PEG") (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o combinaciones de estos, o liposomas de circulación prolongada o liposomas furtivos). Los conjugados de oligómeros de la divulgación también pueden comprender moléculas PEG unidas covalentemente de varios pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos diana. Esta clase de portadores farmacológicos resiste la opsonización y eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), con lo cual posibilita tiempos de circulación sanguínea más prolongados y una mayor exposición tisular para el fármaco encapsulado (Lasic *et al.*, *Chem. Rev*. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata *et al*., *Chem. Pharm. Bull*. 1995, 43, 1005-1011). Se ha mostrado que dichos liposomas se acumulan selectivamente en los tumores, presumiblemente por extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic *et al.*, *Science* 1995, 267, 1275-1276; Oku *et al.*, 1995, *Biochim. Biophys. Acta*, 1238, 86-90). Los liposomas con circulación prolongada aumentan la farmacocinética y la farmacodinámica del ADN y el ARN, particularmente en comparación con los liposomas catiónicos convencionales de los que se tiene constancia que se acumulan en los tejidos del MPS (Liu *et al.*, *J. Biol. Chem*. 1995, 42, 24864-24870; Choi *et al*., Publicación PCT internacional N.º WO 96/10391; Ansell *et al*., Publicación PCT internacional N.º WO 96/10390; Holland *et al*., Publicación PCT internacional N.º WO 96/10392). También es probable que los liposomas con circulación prolongada protejan los fármacos de la degradación con nucleasas hasta un grado mayor en comparación con los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en los tejidos del MPS con un metabolismo rápido tales como el hígado y el bazo.

En una realización adicional, la presente divulgación incluye composiciones farmacéuticas de oligómeros antisentido preparadas para su suministro tal como se describe en las Pat. de EE. UU. N.os: 6 692 911; 7 163 695 y 7 070 807. A este respecto, en una realización, la presente divulgación proporciona un oligómero antisentido de la presente divulgación en una composición que comprende copolímeros de lisina e histidina (HK) (tal como se describe en las Pat. de EE. UU. N.os: 7 163 695; 7 070 807 y 6 692 911), solos o combinados con PEG (por ejemplo, PEG ramificado o no ramificado

o una mezcla de ambos), combinados con PEG y un resto de direccionamiento, o cualquiera de los anteriores combinado con un agente reticulante. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona oligómeros antisentido en composiciones farmacéuticas que comprenden polihistidina modificada con ácido glucónico o polihistidina gluconilada/transferrina-polilisina. Un experto en la técnica también reconocerá que se pueden sustituir aminoácidos con propiedades similares a His y Lys dentro de la composición.

También puede haber presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes (tales como laurilsulfato sódico y estearato magnésico), agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes aromatizantes, conservantes y antioxidantes en las composiciones.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes hidrosolubles tales como ácido ascórbico, clohidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes liposolubles tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen los adecuados para administración oral, nasal, tópica (incluida bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar de forma conveniente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma farmacéutica individual variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo concreto de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material portador para producir una forma farmacéutica individual será generalmente la cantidad de principio activo que produzca un efecto terapéutico. Por lo general, esta cantidad oscilará de aproximadamente un 0,1 por ciento a aproximadamente un noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente un 5 por ciento a aproximadamente un 70 por ciento, más preferentemente de aproximadamente un 10 por ciento a aproximadamente un 30 por ciento.

En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación comprende un excipiente seleccionado entre ciclodextrinas, celulosas, liposomas,

agentes que forman micelas, por ejemplo, ácidos biliares y portadores poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un oligómero antisentido de la presente divulgación. En una realización, el oligómero antisentido de la formulación es acorde a la Fórmula (IV). En una realización, el oligómero antisentido de la formulación es acorde a la Fórmula (IVa). En determinadas realizaciones, una formulación mencionada anteriormente hace que un oligómero antisentido de la presente divulgación sea biodisponible por vía oral.

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

Las formulaciones de la divulgación adecuadas para administración oral pueden encontrarse en forma de cápsulas, obleas, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (utilizando una base con sabor, normalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como lavados bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un oligómero antisentido de la presente divulgación como un principio activo. Un oligómero antisentido de la presente divulgación también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En las formas farmacéuticas sólidas de la divulgación para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, tabletas y similares), el principio activo se puede mezclar con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables tales como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) rellenos o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato sódico; (5) agentes retardantes de la disolución tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario y tensioactivos tales como poloxámero y laurilsulfato sódico; (7) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico,

monoestearato de glicerol y tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes tales como caolín y arcillo bentonita; (9) lubricantes tales como talco, estearato cálcico, estearato magnésico, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, estearato de zinc, estearato de sodio, ácido esteárico y mezclas de estos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes de liberación controlada tales como crospovidona o etilcelulosa. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. También se pueden emplear composiciones farmacéuticas sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina con cubierta blanda y dura utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares lácteos, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido se puede preparar por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos preparados por compresión se pueden preparar utilizando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados se pueden preparar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo hidratado con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente pueden ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos muy conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. También se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo en ellos utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en varias proporciones para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden formularse para una liberación rápida, por ejemplo, liofilizarse. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones farmacéuticas sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes del uso. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden tener una composición tal que liberen el principio o principios activos solamente, o preferencialmente, en una porción determinada del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de forma retardada. Los ejemplos de composiciones de integración que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio

activo también se puede encontrar en forma microencapsulada, si procede, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral de los oligómeros antisentido de la divulgación incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato bencílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de estos.

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

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

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

Las formulaciones o formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un oligómero proporcionadas en la presente incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Los conjugados de oligómeros activos se pueden mezclar en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones o propelentes que se puedan requerir. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de la presente divulgación, excipientes tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto,

derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de estos.

Los polvos y aerosoles pueden contener, además de un oligómero antisentido de la presente divulgación, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener, además, propelentes habituales tales como clorofluorohidrocarbonos e hidrocarburos no sustituidos volátiles tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de un oligómero antisentido de la presente divulgación al cuerpo. Dichas formas farmacéuticas se pueden preparar disolviendo o dispersando el oligómero en el medio adecuado. Se pueden utilizar también potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del agente a través de la piel. La velocidad de dicho flujo se puede controlar proporcionando una membrana que controle la velocidad o dispersando el agente en una matriz polimérica o gel, entre otros métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender uno o más conjugados de oligómeros de la divulgación combinados con una o más soluciones acuosas o no acuosas isotónicas, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles, o polvos estériles que se pueden reconstituir en forma de soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, farmacéuticamente aceptables que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bactericidas, solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Se puede mantener una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. En una realización, el oligómero antisentido de la composición farmacéutica es acorde a la Fórmula (IV). En una realización, el oligómero antisentido de la composición farmacéutica es acorde a la Fórmula (IVa).

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

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

Las formas de acción lenta inyectables se pueden producir formando matrices de microencapsulación de los conjugados de oligómeros objeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicolida. Dependiendo de la proporción de oligómero respecto a polímero y la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del oligómero. Algunos ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de acción lenta también se pueden preparar atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos corporales.

Cuando los oligómeros antisentido de la presente divulgación se administran como productos farmacéuticos a seres humanos y animales, se pueden proporcionar por sí solos o en forma de una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, de un 0,1 a un 99 % (más preferentemente, de un 10 a un 30 %) del oligómero antisentido combinado con un portador farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones o preparados de la presente divulgación se pueden proporcionar por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Estos se proporcionan habitualmente en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsulas, mediante inyección, inhalación, loción

ocular, pomada, supositorio o infusión; por vía tópica mediante una loción o pomada; o por vía rectal con supositorios.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los oligómeros antisentido de la presente divulgación, que se pueden utilizar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden formular en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración concretos, sin que sea tóxico para el paciente de una forma inaceptable.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una serie de factores que incluyen la actividad del oligómero antisentido particular de la presente divulgación empleado, o el éster, sal o amida de este, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción o metabolismo del oligómero particular que se esté empleando, la velocidad y extensión de la absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el oligómero particular empleado, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico previo del paciente que se esté tratando, y factores similares muy conocidos en las técnicas médicas.

Un facultativo o veterinario que tenga la capacidad habitual en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el facultativo o veterinario podría comenzar las dosis de los oligómeros antisentido de la divulgación empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un oligómero antisentido de la divulgación será la cantidad del oligómero antisentido que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos en la presente. Por lo general, las dosis orales, intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los oligómeros antisentido de esta divulgación para un paciente, cuando se utilizan para los efectos indicados, oscilarán de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día.

En algunas realizaciones, los oligómeros antisentido de la presente divulgación se administran en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis para administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg.

En algunas realizaciones, el oligómero antisentido de Fórmula (I) se administra en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del oligómero antisentido de Fórmula (I) para la administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido de Fórmula (II) se administra en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del oligómero antisentido de Fórmula (II) para administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido de Fórmula (III) se administra en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del oligómero antisentido de Fórmula (III) para la administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido de Fórmula (IV) se administra en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del oligómero antisentido de Fórmula (IV) para administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido de Fórmula (IVa) se administra en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del oligómero antisentido de Fórmula (IVa) para la administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido de Fórmula (V) se administra en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del oligómero antisentido de Fórmula (V) para administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, el oligómero antisentido de Fórmula (VI) se administra en dosis por lo general de aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg. En algunas realizaciones, las dosis del oligómero antisentido de Fórmula (VI) para administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg/kg.

Tal como se sobreentendería en la técnica, las administraciones semanales, bisemanales, cada tres semanas o mensuales pueden ser en una o más administraciones o subdosis tal como se discute en la presente.

Las moléculas de ácido nucleico y oligómeros antisentido descritos en la presente se pueden administrar a las células por una serie de métodos conocidos por aquellos familiarizados con la técnica, que incluyen, sin carácter restrictivo, encapsulación en liposomas, por iontoforesis o por incorporación en otros vehículos tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, tal como se describen en la presente y se conocen en la técnica. En determinadas realizaciones, se puede utilizar tecnología de microemulsificación para mejorar la biodisponibilidad de los agentes farmacéuticos lipófilos (insolubles en agua). Los ejemplos incluyen Trimetrine (Dordunoo, S. K., *et al*., *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17(12), 1685-1713, 1991) y REV 5901 (Sheen, P. C., *et al*., *J Pharm Sci* 80(7), 712-714, 1991). Entre otros beneficios, la microemulsificación proporciona una biodisponibilidad mejorada dirigiendo preferencialmente la absorción al sistema linfático en lugar de al sistema circulatorio, lo cual elude de este modo el hígado y evita la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.

En un aspecto de la divulgación, las formulaciones contienen micelas formadas a partir de un oligómero proporcionado en la presente y al menos un portador anfifílico, en el cual las micelas tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 100 nm. Algunas realizaciones más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 50 nm, y realizaciones aún más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 30 nm, o incluso inferior a aproximadamente 20 nm.

Aunque se contemplan todos los portadores anfifílicos adecuados, los portadores preferidos en la actualidad generalmente son aquellos que tienen un estatus de generalmente reconocidos como seguros (GRAS), y que pueden tanto solubilizar un oligómero antisentido de la presente divulgación como microemulsionarlo en una etapa posterior cuando la solución entra en contacto con una fase acuosa compleja (tal como una encontrada en el tracto gastrointestinal humano). Normalmente, los ingredientes anfifílicos que satisfacen estos requisitos tienen valores de HLB (balance hidrófilo a lipófilo) de 2-20 y sus estructuras contienen radicales alifáticos de cadena lineal en el intervalo de C-6 a C-20. Algunos ejemplos son glicéridos grasos polietilenglicolizados y polietilenglicoles.

Los ejemplos de portadores anfifílicos incluyen glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolizados saturados y monoinsaturados tales como los obtenidos a partir de varios aceites vegetales total o parcialmente hidrogenados. Dichos aceites pueden estar constituidos convenientemente por tri-, di- y monoglicéridos de ácidos grasos y di- y

monoésteres de polietilenglicol de los correspondientes ácidos grasos, con una composición de ácidos grasos particularmente preferida que incluye un 4-10 % de ácido cáprico, un 3-9 % de ácido cáprico, un 40-50 % de ácido láurico, un 14-24 % de ácido mirístico, un 4-14 % de ácido palmítico y un 5-15 % de ácido esteárico. Otra clase útil de portadores anfifílicos incluye sorbitano y/o sorbitol parcialmente esterificado, con ácidos grasos saturados o monoinsaturados (serie SPAN) o los correspondientes análogos etoxilados (serie TWEEN).

Los portadores anfifílicos comercializados pueden ser particularmente útiles, incluidas la serie Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglicol (todos fabricados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), monooleato de PEG, dioleato de PEG, monolaurato y dilaurato de PEG, Lecitina, Polisorbato 80, etc. (producidos y distribuidos por una serie de empresas en EE. UU. y en todo el mundo).

En determinadas realizaciones, el suministro puede tener lugar mediante el uso de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares para la introducción de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación en células hospedadoras adecuadas. En particular, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden formular para su suministro encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similar. La formulación y el uso de dichos vehículos de suministro se pueden llevar a cabo utilizando técnicas conocidas y convencionales.

Los polímeros hidrófilos adecuados para su uso en la presente divulgación son aquellos que se disuelven fácilmente en agua, se pueden unir covalentemente a un lípido que forma vesículas y que son tolerados *in vivo* y sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico (también denominado polilactida), poliglicólico (también denominado poliglicolida), un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico y alcohol polivinílico. En determinadas realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular promedio ponderado de desde aproximadamente 100 o 120 daltons hasta aproximadamente 5000 o 10 000 daltons, o desde aproximadamente 300 daltons hasta aproximadamente 5000 daltons. En otras realizaciones, el polímero es polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio ponderado de desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 5000 daltons, o que tiene un peso molecular promedio ponderado de desde aproximadamente 300 hasta aproximadamente 5000 daltons. En determinadas realizaciones, el polímero es un polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio ponderado de aproximadamente 750 daltons, por ejemplo, PEG (750). Los polímeros

también se pueden definir por el número de monómeros en ellos; una realización preferida de la presente divulgación utiliza polímeros de al menos aproximadamente tres monómeros tales como polímeros de PEG constituidos por tres monómeros que tienen un peso molecular de aproximadamente 132 daltons.

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

En determinadas realizaciones, una formulación de la presente divulgación comprende un polímero biocompatible seleccionado del grupo constituido por poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, polímeros de polivinilo, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de estos, celulosas, polipropileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, ácido polibutílico, ácido polivalérico, poli(lactida-co-caprolactona), polisacáridos, proteínas, ácidos polihialurónicos, policianoacrilatos y combinaciones, mezclas o copolímeros de estos.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, constituidos por 6, 7 u 8 unidades de glucosa, designados por la letra griega α, β o γ, respectivamente. Las unidades de glucosa están unidas por enlaces α-1,4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación de silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) se localizan en un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 se sitúan en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrófilas, lo que hace que las ciclodextrinas sean hidrosolubles. Por el contrario, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrófobas, ya que están revestidas por el hidrógeno de los átomos C-3 y C-5, y por oxígenos de tipo éter. Estas matrices permiten la formación de complejos con varios compuestos relativamente hidrófobos, que incluyen, por ejemplo, compuestos esteroideos tales como 17α-estradiol (remítase, por ejemplo, a van Uden *et al*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 38:1-3-113 (1994)). La formación de complejos tiene lugar mediante interacciones de Van der Waals y mediante formación de puentes de hidrógeno. Para consultar una revisión general de la química de las ciclodextrinas, remítase a Wenz, Agnew*. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33:803-822 (1994).

Las propiedades fisicoquímicas de los derivados de ciclodextrina dependen en gran medida del tipo y el grado de sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua varía de insoluble (por ejemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) a un 147 % soluble (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos disolventes orgánicos. Las propiedades

de las ciclodextrinas permiten el control sobre la solubilidad de varios componentes de la formulación aumentando o disminuyendo su solubilidad.

Se han descrito numerosas ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), *et al*. (Pat. de EE. UU. N.º 3 453 259) y Gramera, *et al*. (Pat. de EE. UU. N.º 3 459 731) describieron ciclodextrinas electrónicamente neutras. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), Pat. de EE. UU. N.º 3 453 257], ciclodextrinas reticuladas insolubles (Solms, Pat. de EE. UU. N.º 3 420 788), y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), Pat. de EE. UU. N.º 3 426 011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, se han añadido ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfónicos, ácidos tiosulfínicos y ácidos sulfónicos a la ciclodextrina precursora [remítase, a Parmeter (III), Pat. de EE. UU. N.º 3 453 257]. Además, algunos derivados éter sulfoalquílico de ciclodextrina han sido descritos por Stella, *et al*. (Pat. de EE. UU. N.º 5 134 127).

Los liposomas constan de al menos una membrana bicapa lipídica que encierra un compartimento interno acuoso. Los liposomas se pueden caracterizar por el tipo y el tamaño de la membrana. Las vesículas unilamelares de pequeño tamaño (SUV) tienen una única membrana y habitualmente oscilan entre 0,02 y 0,05 µm de diámetro, las vesículas unilamelares de gran tamaño (LUV) son habitualmente mayores de 0,05 µm. Las vesículas de gran tamaño oligolamelares y las vesículas multilamelares tienen múltiples membranas, normalmente concéntricas, y habitualmente son mayores de 0,1 µm. Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas de menor tamaño contenidas dentro de una vesícula mayor, se denominan vesículas multivesiculares.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a formulaciones que comprenden liposomas que contienen un oligómero antisentido de la presente divulgación, donde la membrana del liposoma se formula para que proporcione un liposoma con mayor capacidad de transporte. Como alternativa, o de forma adicional, el oligómero antisentido de la presente divulgación puede estar contenido dentro de la bicapa liposómica del liposoma, o adsorbido a esta. Se puede agregar un oligómero antisentido de la presente divulgación con un tensioactivo lipídico y transportarse dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma se formula para que resista los efectos disruptivos del agregado de agente activo-tensioactivo.

De acuerdo con una realización de la presente divulgación, la bicapa lipídica de un liposoma contiene lípidos derivatizados con polietilenglicol (PEG), de modo que las

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

Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente divulgación se encuentran en forma solubilizada. Se pueden atrapar agregados de tensioactivos y agentes activos (tales como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) dentro del espacio interior de los liposomas de acuerdo con la presente divulgación. Un tensioactivo actúa dispersando y solubilizando el agente activo, y se puede seleccionar entre cualquier tensioactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, que incluyen, sin carácter limitante, lisofosfatidilcolinas (LPG) biocompatibles de longitudes de cadena variables (por ejemplo, de aproximadamente C14 a aproximadamente C20). También se pueden utilizar lípidos derivatizados con polímeros tales como PEG-lípidos para la formación de micelas, debido a que actuarán inhibiendo la fusión micela/membrana, y debido a que la adición de un polímero a las moléculas de tensioactivo reduce el CMC del tensioactivo y contribuye a la formación de micelas. Se prefieren tensioactivos con CMO en el rango micromolar; se pueden utilizar tensioactivos con CMC superior para preparar micelas atrapadas dentro de los liposomas de la presente divulgación.

Los liposomas de acuerdo con la presente divulgación se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas que se conocen en la técnica. Remítase, por ejemplo, a la Pat. de EE. UU. N.º 4 235 871; Solicitud PCT publicada WO 96/14057; *New RRC, Liposomes: A practical approach*, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104 y Lasic DD, *Liposomes from physics to applications*, Elsevier Science Publishers BV, Ámsterdam, 1993. Por ejemplo, los liposomas de la presente divulgación se pueden preparar difundiendo un lípido derivatizado con un polímero hidrófilo en liposomas preformados, tal como exponiendo los liposomas preformados a micelas compuestas por polímeros con injertos de lípidos, con concentraciones de lípidos correspondientes al porcentaje molar final de lípido derivatizado que se desee en el liposoma. También se pueden formar liposomas que contienen un polímero hidrófilo mediante técnicas de homogenización, hidratación del campo lipídico o extrusión, como se conocen en la técnica.

En otro procedimiento de formulación ilustrativo, el agente activo se dispersa en primer lugar por sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro tensioactivo con CMC bajo (que incluye lípidos con injertos de polímeros) que solubiliza fácilmente moléculas hidrófobas. La suspensión micelar resultante de agente activo se utiliza a continuación

para rehidratar una muestra lipídica secada que contiene un porcentaje molar adecuado de lípido con injerto de polímeros, o colesterol. A continuación, se da a la suspensión de lípido y agente activo forma de liposomas utilizando técnicas de extrusión conocidas en la técnica, y los liposomas resultantes se separan de la solución no encapsulada mediante separación en columnas estándar.

En un aspecto de la presente divulgación, los liposomas se preparan de modo que tengan tamaños sustancialmente homogéneos en un rango de tamaños seleccionado. Un método de selección de tamaños eficaz conlleva extruir una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana se corresponderá aproximadamente con los tamaños mayores de los liposomas producidos por extrusión a través de esa membrana. Remítase, por ejemplo, a la Pat. de EE. UU. N.º 4 737 323 (12 de abril de 1988). En determinadas realizaciones, se pueden utilizar reactivos tales como DharmaFECT® y Lipofectamine® para introducir polinucleótidos o proteínas en las células.

Las características de liberación de una formulación de la presente divulgación dependen del material encapsulante, la concentración de fármaco encapsulado y la presencia de modificadores de la liberación. Por ejemplo, la liberación se puede manipular para que dependa del pH, por ejemplo, utilizando un recubrimiento sensible al pH que libere solamente a un pH bajo, como en el estómago, o a un pH superior, como en el intestino. Se puede utilizar un recubrimiento entérico para evitar que la liberación tenga lugar hasta después del paso a través del estómago. Se pueden utilizar múltiples recubrimientos o mezclas de cianamida encapsuladas en diferentes materiales para obtener una liberación inicial en el estómago, seguida de una liberación posterior en el intestino. La liberación también se puede manipular mediante la inclusión de sales o agentes de formación de poros, que pueden aumentar la captación de agua o liberar un fármaco por difusión a partir de la cápsula. También se pueden utilizar excipientes que modifiquen la solubilidad del fármaco para controlar la velocidad de liberación. También se pueden incorporar agentes que mejoren la degradación de la matriz o la liberación a partir de la matriz. Pueden añadirse al fármaco, añadirse como una fase separada (es decir, como materiales particulados), o pueden codisolverse en la fase polimérica dependiendo del compuesto. En la mayor parte de los casos, la cantidad debería ser de entre un 0,1 y un 30 por ciento (p/p de polímero). Los tipos de potenciadores de la degradación incluyen sales inorgánicas tales como sulfato amónico y cloruro amónico, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido benzoico y ácido

ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de zinc e hidróxido de zinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y tensioactivos tales como Tween® y Pluronic®. Los agentes formadores de poros que añaden microestructura a las matrices (es decir, compuestos hidrosolubles tales como sales inorgánicas y azúcares) se añaden como materiales particulados. El intervalo es habitualmente entre un uno y un treinta por ciento (p/p de polímero).

La captación también se puede manipular alterando el tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto se puede lograr, por ejemplo, recubriendo la partícula con un polímero que se adhiera a las mucosas, o seleccionándolo como el material encapsulante. Los ejemplos incluyen la mayoría de polímeros con grupos carboxilo libres tales como quitosano, celulosas y especialmente poliacrilatos (tal como se utiliza en la presente, poliacrilatos se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

Un oligómero antisentido se puede formular para que esté contenido dentro de un dispositivo o implante médico o quirúrgico, o adaptado para la liberación con este. En determinados aspectos, un implante puede estar recubierto o tratado de otro modo con un oligómero antisentido. Por ejemplo, se pueden utilizar hidrogeles u otros polímeros tales como polímeros biocompatibles y/o biodegradables para recubrir un implante con las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación (es decir, la composición se puede adaptar para su uso con un dispositivo médico utilizando un hidrogel u otro polímero). Los polímeros y copolímeros para recubrir dispositivos médicos con un agente son muy conocidos en la técnica. Los ejemplos de implantes incluyen, sin carácter limitante, estents, estents que eluyen fármacos, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéteres de diálisis, injertos vasculares, válvulas cardiacas protésicas, marcapasos cardiacos, desfibriladores cardioversores implantables, agujas IV, dispositivos para fijación y formación ósea tales como clavos, tornillos, placas y otros dispositivos y matrices de tejido artificial para la cicatrización de heridas.

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

aminoglucósidos, inhibidores del proteasoma y terapias de aumento de expresión (por ejemplo, aumento de la expresión de utropina, un parálogo autosómico de la distrofina).

En algunas realizaciones, el producto terapéutico adicional se puede administrar antes, simultánea o posteriormente a la administración del oligómero antisentido de la presente divulgación. Por ejemplo, los oligómeros antisentido se pueden administrar combinados con un esteroide y/o antibiótico. En determinadas realizaciones, los oligómeros antisentido se administran a un paciente que está recibiendo una terapia con esteroides de base (por ejemplo, terapia con esteroides de base intermitente o crónica/continua). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el paciente ha sido tratado con un corticoesteroide antes de la administración de un oligómero antisentido y continúa recibiendo la terapia de esteroides. En algunas realizaciones, el esteroide es un glucocorticoide o prednisona.

Se pretende que las vías de administración descritas sirvan solamente como guía, ya que un médico experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración óptima y cualquier dosis para cualquier animal y afección particulares. Se han intentado múltiples estrategias para introducir material genético nuevo funcional en las células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedmann (1989) *Science*, 244:1275-1280). Estas estrategias incluyen la integración del gen a expresar en retrovirus modificados (Friedmann (1989) *supra*; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S-5079S); la integración en vectores no retrovirales (por ejemplo, vectores virales adenoasociados) (Rosenfeld, *et al*. (1992) *Cell*, 68:143-155; Rosenfeld, *et al*. (1991) *Science*, 252:431-434); o el suministro de un transgén unido a un elemento promotor-potenciador heterólogo mediante liposomas (Friedmann (1989), *supra*; Brigham, *et al*. (1989) *Am. J. Med. Sci*., 298:278-281; Nabel, *et al*. (1990) *Science*, 249:1285-1288; Hazinski, *et al*. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol*., 4:206-209; y Wang y Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7851-7855); acoplados a sistemas de transporte basados en cationes con especificidad por ligandos (Wu y Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14621-14624) o el uso de vectores de expresión de ADN desnudo (Nabel *et al*. (1990), *supra*; Wolff *et al*. (1990) *Science*, 247:1465-1468). La inyección directa de transgenes en un tejido produce solamente expresión localizada (Rosenfeld (1992) *supra*; Rosenfeld *et al*. (1991) *supra*; Brigham *et al*. (1989) *supra*; Nabel (1990) *supra;* y Hazinski *et al*. (1991) *supra*). El grupo de Brigham *et al*. (*Am. J. Med. Sci*. (1989) 298:278-281 y *Clinical Research* (1991) 39 (resumen)) ha descrito la transfección *in vivo* solamente de pulmones de ratones después de la administración intravenosa o intratraqueal de un complejo con liposomas de ADN. Un ejemplo de un artículo de

revisión de procedimientos de terapia génica humana es: Anderson, *Science* (1992) 256:808-813.

En una realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender, además, un carbohidrato proporcionado en Han *et al*., *Nat. Comms*. 7, 10981 (2016) que se incorpora en su totalidad a la presente por referencia. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender un 5 % de carbohidrato de tipo hexosa. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la divulgación puede comprender un 5 % de glucosa, un 5 % de fructosa o un 5 % de manosa. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender un 2,5 % de glucosa y un 2,5 % de fructosa. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender un carbohidrato seleccionado entre: arabinosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, glucosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, sorbitol presente en una cantidad de un 5 % en volumen, galactosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, fructosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, xilitol presente en una cantidad de un 5 % en volumen, manosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, una combinación de glucosa y fructosa presentes cada una en una cantidad de un 2,5 % en volumen y una combinación de glucosa presente en una cantidad de un 5,7 % en volumen, fructosa presente en una cantidad de un 2,86 % en volumen y xilitol presente en una cantidad de un 1,4 % en volumen.

IV. <u>Métodos de uso</u>

Restauración del marco de lectura de la distrofina utilizando salto de exones

Una estrategia terapéutica potencial para el tratamiento de la DMD, provocada por mutaciones fuera del marco en el gen de distrofina, es sugerida por la forma más leve de distrofinopatía conocida como BMD, que está causada por mutaciones dentro del marco. La capacidad para convertir una mutación fuera del marco en una mutación dentro del marco preservaría hipotéticamente el marco de lectura del ARNm y produciría una proteína de distrofina acortada internamente pero funcional. Los oligómeros antisentido de la divulgación se diseñaron para lograr esto.

La hibridación del oligómero antisentido de Fórmula (I), Fórmula (II), Fórmula (III), Fórmula (IV), Fórmula (IVa), Fórmula (V), Fórmula (VI) con la secuencia de preARNm diana interfiere con la formación del complejo de corte y empalme del preARNm y elimina el exón 50 del ARNm maduro. La estructura y la conformación de los oligómeros antisentido de la divulgación permiten un apareamiento de bases con especificidad de secuencia con la secuencia complementaria.

El ARNm de distrofina normal que contiene los 79 exones producirá la proteína de distrofina normal. La forma de cada exón representa cómo los codones se dividen entre exones; cabe destacar que un codón consta de tres nucleótidos. Los exones con forma rectangular comienzan y terminan con codones completos. Los exones con forma de flecha comienzan con un codón completo, pero terminan con un codón dividido, que contiene solamente el nucleótido n.º 1 del codón. Los nucleótidos n.º 2 y n.º 3 de este codón están contenidos en el exón posterior que comenzará con una forma de chevrón.

Los resultados clínicos para analizar el efecto de un oligómero antisentido que es complementario a una región diana del exón 50, intrón 49 y/o intrón 50 del preARNm de distrofina humana e induce el salto del exón 50 incluyen el porcentaje de fibras positivas para distrofina (PDPF), prueba de seis minutos de paseo (6MWT), pérdida de ambulación (LOA), evaluación ambulatoria North Star (NSAA), pruebas de función pulmonar (PFT), capacidad de levantarse (desde una posición supina) sin apoyo externo, producción de distrofina *de novo* y otras medidas funcionales.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para producir distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligómero antisentido o una sal farmacéuticamente aceptable de este, tal como se ha descrito en la presente. En determinadas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para restablecer un marco de lectura de ARNm con el fin de inducir la producción de proteína de distrofina en un sujeto con distrofia muscular de Duchenne (DMD) que tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50. La producción de proteína se puede medir mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), análisis de inmunostransferencia de Western o inmunohistoquímica (IHC).

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para tratar la DMD en un sujeto que lo necesite, donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligómero antisentido o una sal farmacéuticamente aceptable de este, tal como se ha descrito en la presente. En varias realizaciones, el tratamiento del sujeto se mide por el retraso de la progresión de la enfermedad. En algunas realizaciones, el tratamiento del sujeto se mide por el mantenimiento de la ambulación en el sujeto o la reducción de la pérdida de ambulación en el sujeto. En algunas realizaciones, la ambulación se mide utilizando la Prueba de 6 minutos caminando

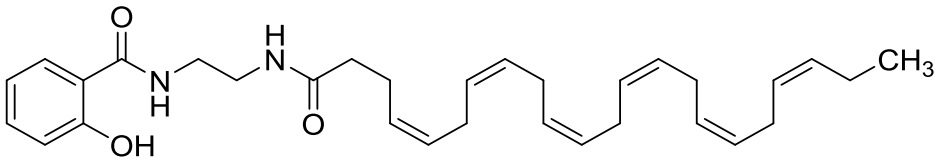
(6MWT). En determinadas realizaciones, la ambulación se mide utilizando la Evaluación ambulatoria North Start (NSAA).

En varias realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para mantener la función pulmonar o reducir la pérdida de función pulmonar en un sujeto con DMD, donde el sujeto tiene una mutación del gen de DMD que es susceptible de salto del exón 50, comprendiendo el método administrar al sujeto un oligómero antisentido o una sal farmacéuticamente aceptable de este, tal como se ha descrito en la presente. En algunas realizaciones, la función pulmonar se mide como Presión espiratoria máxima (PEM). En determinadas realizaciones, la función pulmonar se mide como Presión inspiratoria máxima (PIM). En algunas realizaciones, la función pulmonar se mide como Capacidad vital forzada (CVF).

En una realización adicional, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden coadministrar con un carbohidrato en los métodos de la divulgación, en la misma formulación o es una formulación separada, tal como se proporciona en Han *et al*., *Nat. Comms*. 7, 10981 (2016), que se incorpora en su totalidad a la presente por referencia. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden coadministrar con un 5 % de un carbohidrato de tipo hexosa. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden coadministrar con un 5 % de glucosa, un 5 % de fructosa o un 5 % de manosa. En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden coadministrar con un 2,5 % de glucosa y un 2,5 % de fructosa. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica de la divulgación se puede coadministrar con un carbohidrato seleccionado entre: arabinosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, glucosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, sorbitol presente en una cantidad de un 5 % en volumen, galactosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, fructosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, xilitol presente en una cantidad de un 5 % en volumen, manosa presente en una cantidad de un 5 % en volumen, una combinación de glucosa y fructosa presentes cada una en una cantidad de un 2,5 % en volumen y una combinación de glucosa presente en una cantidad de un 5,7 % en volumen, fructosa presente en una cantidad de un 2,86 % en volumen y xilitol presente en una cantidad de un 1,4 % en volumen.

En varias realizaciones, un oligómero antisentido de la divulgación se coadministra con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antiinflamatorio no esteroideo. En algunas realizaciones, el compuesto antiinflamatorio no esteroideo es un inhibidor de NF-kB. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el

inhibidor de NF-kB puede ser CAT-1004 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En varias realizaciones, el inhibidor de NF-kB puede ser un conjugado de salicilato y DHA. En algunas realizaciones, el inhibidor de NF-kB es CAT-1041 o una sal farmacéuticamente aceptable de este. En determinadas realizaciones, el inhibidor de NF-kB es un conjugado de salicilato y EPA. En varias realizaciones, el inhibidor de NF-kB es



o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

En algunas realizaciones, el compuesto antiinflamatorio no esteroideo es un inhibidor de TGF-b. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el inhibidor de TGF-b es HT-100.

En determinadas realizaciones, se describe un oligómero antisentido, tal como se ha descrito en la presente para su uso en terapia. En determinadas realizaciones, se describe un oligómero antisentido, tal como se ha descrito en la presente para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. En determinadas realizaciones, se describe un oligómero antisentido, tal como se ha descrito en la presente para su uso en la fabricación de un medicamento para su uso en terapia. En determinadas realizaciones, se describe un oligómero antisentido, tal como se ha descrito en la presente para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

V. <u>Kits</u>

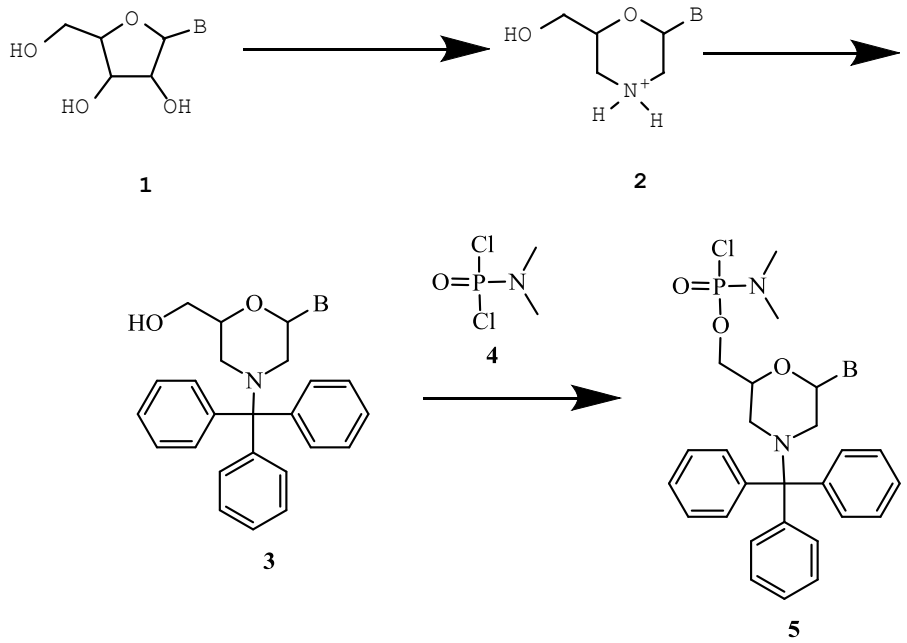
La divulgación también proporciona kits para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética, donde el kit comprende al menos una molécula antisentido (por ejemplo, un oligómero antisentido que comprende la secuencia de bases expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO. 1-9), empaquetados en un recipiente adecuado, junto con instrucciones para su uso. Los kits pueden contener también reactivos periféricos tales como tampones, estabilizantes, etc. Los expertos en el campo deberían apreciar que las aplicaciones del método anterior tienen una amplia aplicación para identificar moléculas antisentido adecuadas para su uso en el tratamiento de otras muchas enfermedades. En una realización, el kit comprende un oligómero antisentido de acuerdo con cualquiera de las Fórmulas (I)-(VI).

Ejemplos

Aunque la anterior divulgación se ha descrito con algo de detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a la luz del contenido de esta divulgación que se pueden llevar a cabo determinados cambios y modificaciones en esta sin alejarse de la naturaleza o alcance de las reivindicaciones anexas. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración solamente y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una serie de parámetros no críticos que se podrían cambiar o modificar para proporcionar resultados esencialmente similares.

Materiales y métodos

Preparación de subunidades morfolino



Esquema 1: ruta de síntesis general para las subunidades PMO

Haciendo referencia al Esquema 1, donde B representa un resto de apareamiento de bases, se pueden preparar las subunidades morfolino a partir del ribonucleósido (**1**) correspondiente mostrado. La subunidad morfolino (**2**) se puede proteger opcionalmente mediante reacción con un precursor de un grupo protector adecuado, por ejemplo, cloruro de tritilo. El grupo protector 3' se elimina generalmente durante la síntesis de oligómeros en estado sólido, tal como se describe en más detalle más adelante. El resto de apareamiento de bases se puede proteger de forma adecuada para la síntesis de oligómeros en fase sólida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoílo para la adenina y la citosina, fenilacetilo para la guanina y pivaloiloximetilo para la hipoxantina (Inosina). El grupo pivaloiloximetilo se puede

introducir en la posición N1 de la base heterocíclica hipoxantina. Aunque se puede emplear una subunidad de hipoxantina no protegida, los rendimientos en las reacciones de activación son muy superiores cuando se protege la base. Otros grupos protectores adecuados incluyen los divulgados en la Patente de EE. UU. N.º 8 076 476, que se incorpora por la presente por referencia en su totalidad.

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

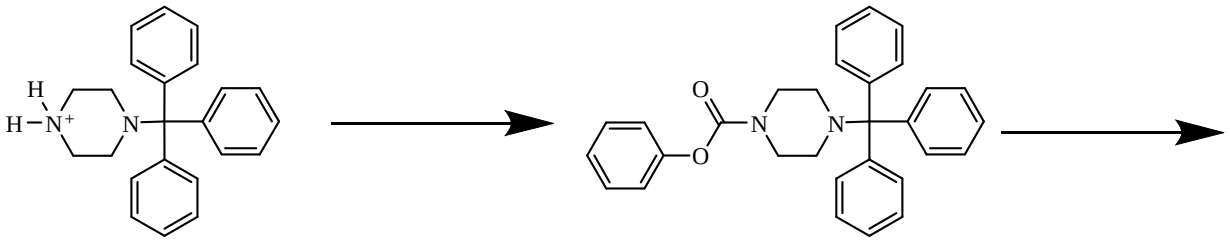
Los compuestos de estructura **4** se pueden preparar utilizando cualquier cantidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. El acoplamiento con el resto morfolino procede a continuación como se ha indicado anteriormente.

Los compuestos de estructura **5** se pueden utilizar en la síntesis de oligómeros en fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces intersubunidades. Dichos métodos son muy conocidos en la técnica. En resumen, un compuesto de estructura **5** se puede modificar en el extremo 5' para que contenga un conector para un soporte sólido. Una vez soportado, el grupo protector de **5** (por ejemplo, tritilo) en el extremo 3' se elimina y la amina libre se hace reaccionar con un resto de fósforo activado de un segundo compuesto de estructura **5**. Esta secuencia se repite hasta que se obtiene el oligo con la secuencia deseada. El grupo protector en el extremo 3' terminal puede eliminarse o dejarse si se desea una modificación 3'. El oligo se puede eliminar del soporte sólido utilizando cualquier cantidad de métodos, o un tratamiento de ejemplo con una base para escindir el enlace al soporte sólido.

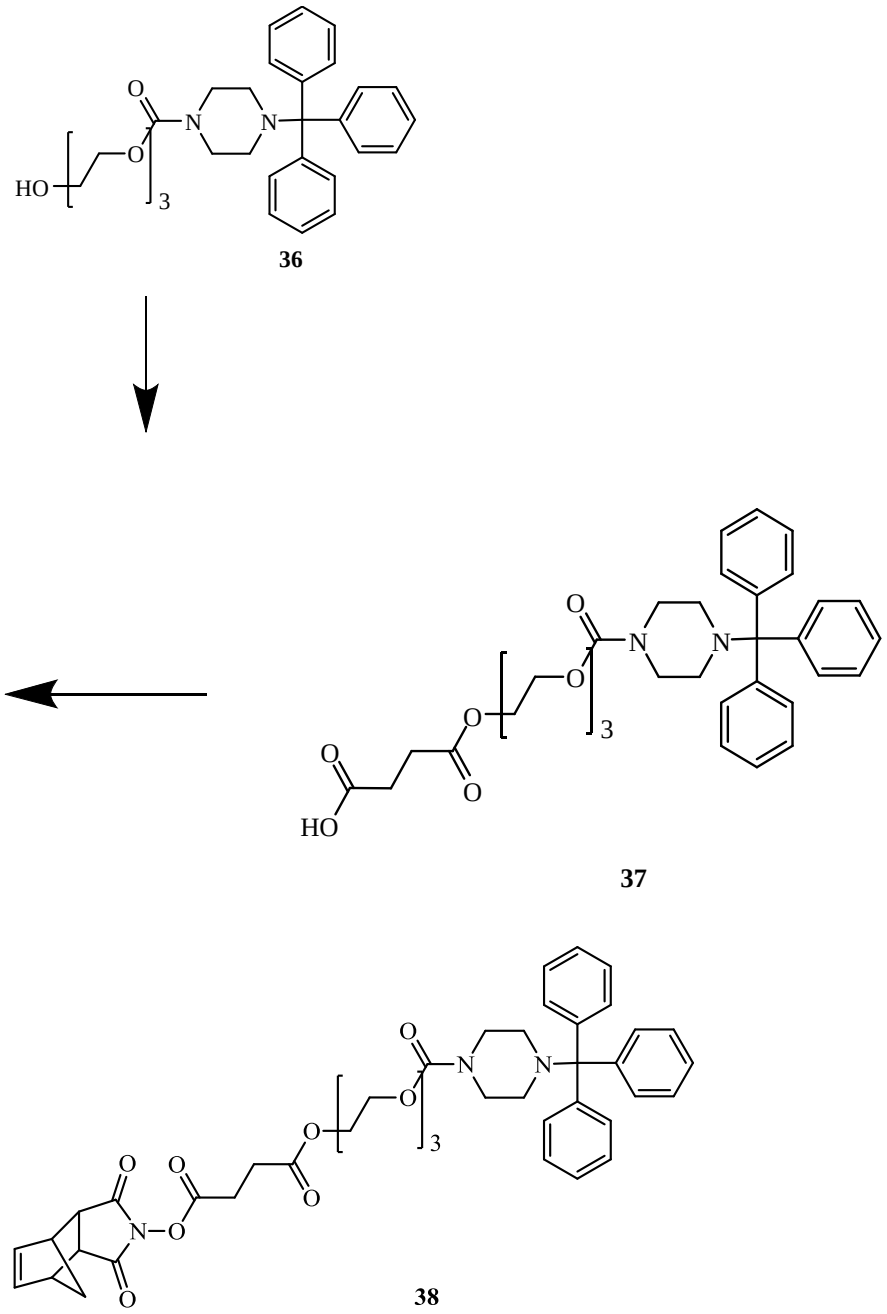
La preparación de oligómeros morfolino en general y de los oligómeros morfolino específicos de la divulgación se describen en más detalle en los Ejemplos.

Preparación de oligómeros morfolino

La preparación de los compuestos de la divulgación se puede llevar a cabo utilizando el siguiente protocolo de acuerdo con el Esquema 2:



11 **35**



Esquema 2: preparación de ácido de Cola activado

Preparación de fenilcarbamato de tritilpiperazina **35**: a una suspensión enfriada de compuesto **11** en diclorometano (6 mL/g de **11**) se añade a una solución de carbonato de potasio (3,2 eq.) en agua (4 mL/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se añade lentamente una solución de cloroformiato de fenilo (1,03 eq.) en diclorometano (2 g/g de cloroformiato de fenilo). La mezcla de reacción se calienta hasta 20 ºC. Al completarse la reacción (1-2 h), las fases se separaron. La fase orgánica se lava con agua, y se seca con carbonato de potasio anhidro. El producto **35** se aísla por cristalización en acetonitrilo.

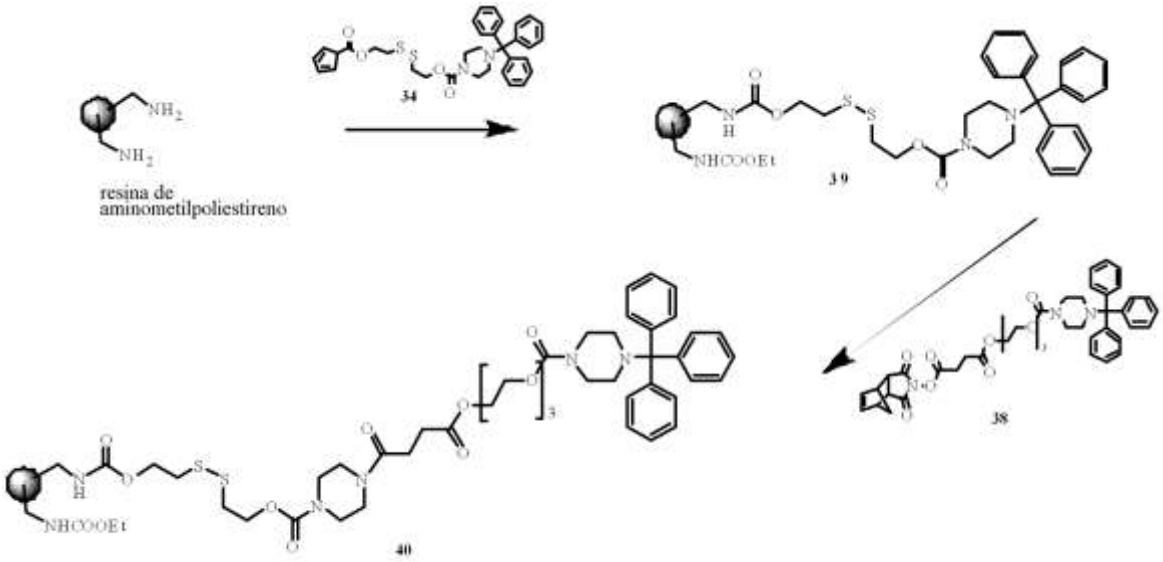
Preparación del alcohol de carbamato **36**: se suspende hidruro sódico (1,2 eq.) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 mL/g de hidruro sódico). Se pueden añadir trietilenglicol (10,0 eq.) y compuesto **35** (1,0 eq.) a esta suspensión. La suspensión densa resultante se calienta hasta 95 ºC. Al completarse la reacción (1-2 h), la mezcla se enfría hasta 20 ºC. A esta mezcla se añade un 30 % de diclorometano/éter metil *tert*-butílico (v:v) y agua. La fase orgánica que contiene producto se lava sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso y cloruro sódico acuoso saturado. El producto 36 se aísla mediante cristalización en diclorometano/éter metil *tert*-butílico/heptano.

Preparación de ácido de Cola **37**: a una solución de compuesto **36** en tetrahidrofurano (7 mL/g de **36**) se añaden anhídrido succínico (2,0 eq.) y DMAP (0,5 eq.). La mezcla se calienta hasta 50 ºC. Al completarse la reacción (5 h), la mezcla se enfría hasta 20 ºC y se ajusta hasta pH 8,5 con $NaHCO_3$ acuoso. Se añade éter metil *tert*-butílico, y el producto se extrae en la fase acuosa. Se añade diclorometano y la mezcla de la fase acuosa se ajusta hasta pH 3 con ácido cítrico acuoso. La fase orgánica que contiene producto se lava con una mezcla de tampón citrato a pH = 3 y cloruro sódico acuoso saturado. Esta solución en diclorometano del compuesto **37** se utiliza sin aislar en la preparación del compuesto **38**.

Preparación del compuesto **38**: se añaden imida del ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1,02 eq.), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq.) y posteriormente clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC) (1,1 eq.) a la solución de compuesto **37**. La mezcla se calienta hasta 55 ºC. Al completarse la reacción (4-5 h), la mezcla se enfría hasta 20 ºC y se lava sucesivamente con ácido cítrico 0,2 M/salmuera 1:1 y salmuera. La solución de diclorometano se somete a un intercambio de disolvente por acetona y después por *N*,*N*-dimetilformamida, y el producto se aísla por precipitación de acetona/*N*,*N*-dimetilformamida en cloruro sódico acuoso saturado. Se vuelve a formar una suspensión densa del producto crudo varias veces en agua para eliminar la *N*,*N*-dimetilformamida y las sales residuales.

Método A de síntesis de PMO: uso de anclaje disulfuro

La introducción de la “Cola” activada en la resina cargada con anclaje se lleva a cabo en dimetilimidazolidinona (DMI) mediante el procedimiento utilizado para la incorporación de las subunidades durante la síntesis en fase sólida.



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

Este procedimiento se puede llevar a cabo en un recipiente encamisado para péptidos silanizado (ChemGlass, NJ EE. UU.) con una frita de vidrio de poro grueso (40-60 µm), agitador de hélice, y una llave de Teflón de 3 vías para permitir el borboteo de N_2 hacia arriba a través de la frita o una extracción con vacío.

Los pasos de lavado/tratamiento de una resina en el siguiente procedimiento constan de dos operaciones básicas: fluidización de la resina o reactor de lecho agitado y extracción con disolvente/solución. Para la fluidización de la resina, la llave se coloca en la posición que permite el flujo de N_2 hacia arriba a través de la frita y el lavado/tratamiento de la resina especificado se añade al reactor y se deja que impregne y humedezca por completo la resina. A continuación se comienza el mezclado y la suspensión densa de la resina se mezcla durante el tiempo especificado. Para la extracción con disolvente/solución, se detienen el mezclado y el flujo de N_2 y se arranca la bomba de vacío y posteriormente la llave se coloca en la posición que permite la evacuación del lavado/tratamiento de la resina para desechar. Todos los volúmenes de lavado/tratamiento de la resina son 15 mL/g de resina a menos que se indique otra cosa.

Se añade 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 mL/g de resina) a la resina de aminometilpoliestireno (retícula 100-200; ~1,0 mmol/g de carga basada en la sustitución de nitrógeno; 75 g, 1 eq., Polymer Labs, RU, parte n.º 1464-X799) en un recipiente encamisado para péptidos silanizado y se deja que la resina se expanda por absorción de disolvente con el mezclado durante 1-2 h. Después de la evacuación del disolvente de absorción, la resina se lava con diclorometano (2 x 1-2 min), un 5 % de diisopropiletilamina en un 25 % de isopropanol/diclorometano (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Después de la evacuación del lavado final, la resina se trata

con una solución de anclaje disulfuro **34** en 1-metil-2-pirrolidinona (0,17 M; 15 mL/g de resina, ~2,5 eq.) y la mezcla de resina/reactivo se calienta a 45 ºC durante 60 h. Al completarse la reacción, se interrumpe el calentamiento y la solución de anclaje se evacúa y la resina se lava con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trata con una solución de dicarbonato de dietilo (DEDC) al 10 % (v/v) en diclorometano (16 mL/g; 2 x 5-6 min) y después se lava con diclorometano (6 x 1-2 min). La resina **39** se seca en una corriente de N_2 durante 1-3 h y después al vacío hasta llegar a un peso constante (± 2 %).

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

Se transfiere un peso conocido de resina seca (25 ± 3 mg) a un matraz volumétrico de 25 mL silanizado y se añaden ~5 mL de ácido trifluoroacético al 2 % (v/v) en diclorometano. El contenido se mezcla revolviendo suavemente y después se deja reposar durante 30 min. El volumen se lleva hasta 25 mL con ácido trifluoroacético adicional al 2 % (v/v) en diclorometano y el contenido se mezcla exhaustivamente. Utilizando una pipeta de desplazamiento positivo, se transfiere una alícuota de la solución que contiene tritilo (500 µL) a un matraz volumétrico de 10 mL y el volumen se lleva hasta 10 mL con ácido metanosulfónico.

El contenido de catión tritilo en la solución final se mide mediante absorción UV a 431,7 nm y se calcula la carga de la resina en grupos tritilo por gramo de resina (µmol/g) utilizando los volúmenes, diluciones, coeficiente de extinción (ε: 41 µmol-1cm-1) y peso de resina adecuados. El ensayo se lleva a cabo por triplicado y se calcula la carga promedio.

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

Carga de la Cola: utilizando el mismo montaje y los mismos volúmenes que para la preparación de la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro, se puede introducir la Cola en el soporte sólido. La resina cargada con anclaje se desprotege en primer lugar en condiciones ácidas y el material resultante se neutraliza antes del acoplamiento. Para el paso de acoplamiento, se utiliza una solución del compuesto **38** (0,2 M) en DMI que contiene 4-etilmorfolina (NEM, 0,4 M) en lugar de 1-metil-2-pirrolidinona para la solución

de anclaje disulfuro. Después de 2 h a 45 ºC, la resina **39** se lava dos veces con un 5 % de diisopropiletilamina en isopropanol/diclorometano al 25 % y una vez con DCM. Se añade una solución de anhídrido benzoico (0,4 M) y NEM (0,4 M) a la resina. Después de 25 min, la camisa del reactor se enfría hasta temperatura ambiente, y la resina se lava dos veces con un 5 % de diisopropiletilamina en isopropanol/diclorometano al 25 % y ocho veces con DCM. La resina **40** se filtra y se seca con alto vacío. La carga para la resina **40** se define de modo que es la carga de la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro original **39** utilizada en la carga de la Cola.

Síntesis en fase sólida: los oligómeros morfolino se preparan en un BioAutomation 128AVB (Plano, TX) fabricado a medida en columnas de reacción de propileno BioComma de 4 mL (Parte n.º CT003-BC). Un bloque de aluminio con canales para el flujo de agua se sitúa alrededor de las columnas al colocarlas en el sintetizador. El AVB128 añade alternativamente soluciones de reactivo/lavado, las retiene durante un tiempo especificado y evacua las columnas utilizando vacío.

Para los oligómeros en el intervalo de hasta aproximadamente 25 subunidades de longitud, se prefiere una resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con una carga próxima a 500 µmol/g de resina. Para oligómeros más largos, se prefiere una resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con una carga de 300-400 µmol/g de resina. Si se desea una molécula con una Cola 5', se selecciona una resina que ha sido cargada con la Cola con las mismas directrices de carga.

Se preparan las siguientes soluciones de reactivos:

Solución de destritilación: 4-cianopiridina al 1 % y ácido trifluoroacético (p/p) en solución de diclorometano/trifluoroetanol 4:1;

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

Solución de acoplamiento: subunidad morfolino activada de la base y tipo de unión deseados 0,18 M (o 0,24 M para los oligómeros que han incorporado más de 20 subunidades) con N-etilmorfolina 0,4 M en solución de 1,3-dimetilimidazolidinona (DMI).

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

En el sintetizador, con el bloque fijado a 42 ºC, se añaden 2 mL de 1-metil-2-pirrolidinona a cada columna que contiene 30 mg de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (o resina de Cola) y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de lavar 2 veces con 2 mL de diclorometano, se puede emplear el siguiente ciclo de síntesis:

Paso	Vol.	Suministro	Tiempo de retención
Destritilación	1,5 mL	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 mL	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 mL	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 mL	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 mL	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 mL	Colector	15 segundos
Destritilación	1,5 mL	Colector	15 segundos
DCM	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
DCM	1,5 mL	Colector	30 segundos
Acoplamiento	350-500uL	Jeringa	40 minutos
DCM	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 mL	Colector	30 segundos
DCM	1,5 mL	Colector	30 segundos
DCM	1,5 mL	Colector	30 segundos
DCM	1,5 mL	Colector	30 segundos

Las secuencias de los oligómeros individuales se programan en el sintetizador de modo que cada columna reciba la solución de acoplamiento apropiada (A, C, G, T o I) en la secuencia apropiada. Cuando el oligómero en una columna ha completado la incorporación de su subunidad final, la columna se retira del bloque y se lleva a cabo un ciclo final manualmente utilizando una solución de acoplamiento que contiene cloruro de 4-metoxitrifenilmetilo (0,32 M en DMI) y 4-etilmorfolino 0,89 M.

Escisión de la resina y eliminación de bases y grupos protectores del esqueleto: después de la metoxitritilación, la resina se lava 8 veces con 2 mL de 1-metil-2-pirrolidinona. Se añade un mL de solución de escisión constituida por 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 M y trietilamina 0,73 M en 1-metil-2-pirrolidinona, la columna se tapa y se deja reposar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de ese tiempo, la solución se vacía en un vial Wheaton de 12 mL. La resina cuyo volumen se ha reducido

considerablemente se lava dos veces con 300 µL de solución de escisión. A la solución se añaden 4,0 mL de amoníaco acuoso conc. (almacenado a -20 ºC), el vial se tapa herméticamente (con un tapón de rosca revestido con Teflón) y la mezcla se revuelve para mezclar la solución. El vial se coloca en un horno a 45 ºC durante 16-24 h para llevar a cabo la escisión de bases y grupos protectores del esqueleto.

Purificación del producto crudo: la solución de aminólisis en el vial se saca del horno y se deja enfriar hasta temperatura ambiente. La solución se diluye con 20 mL de amoníaco acuoso al 0,28 % y se hace pasar a través de una columna de 2,5x10 cm que contiene resina Macroprep HQ (BioRad). Un gradiente salino (A: amoníaco al 0,28 % con B: cloruro sódico 1 M en amoníaco al 0,28%; 0-100 % de B en 60 min) se utiliza para eluir el oligómero protegido con metoxitritilo. Las fracciones combinadas se agrupan y se procesan adicionalmente dependiendo del producto deseado.

Desmetoxitritilación de oligómeros morfolino: las fracciones agrupadas de la purificación Macroprep se tratan con H_3PO_4 1 M para reducir el pH hasta 2,5. Después de un mezclado inicial, las muestras se dejan reposar a temperatura ambiente durante 4 min, momento en el cual se neutralizan hasta pH 10-11 con un 2,8 % de amoníaco/agua. Los productos se purifican mediante extracción en fase sólida (SPE).

Empaquetado y acondicionamiento de la columna SPE: se empaqueta Amberchrome CG-300M (Dow Chemicals (Rohm y Haas) ; Midland, MI) (3 mL) en columnas fritadas de 20 mL (Columnas de cromatografía BioRad Econo-Pac (732-1011)) y la resina se enjuaga con 3 mL de los siguientes: NH_4OH al 0,28 %/acetonitrilo al 80 %; NaOH 0,5 M/etanol al 20 %; agua; H_3PO_4 50 mM/acetonitrilo al 80 %; agua; NaOH 0,5/etanol al 20 %; agua; NH_4OH al 0,28 %.

Purificación SPE: la solución procedente de la desmetoxitritilación se carga en la columna y la resina se enjuaga tres veces con 8 mL de amoníaco acuoso al 0,28 %. Un vial Wheaton (12 mL) se coloca bajo la columna y el producto se puede eluir con dos lavados con 2 mL de acetonitrilo al 45 % en amoníaco acuoso al 0,28 %.

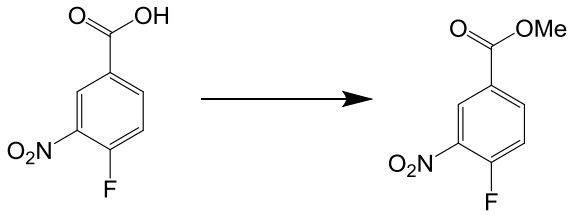
Aislamiento del producto: las soluciones se congelan en hielo seco y los viales se colocan en un liofilizador durante al menos dos días para producir un polvo blanco esponjoso. A continuación, las muestras se disuelven en agua, se filtran a través de un filtro de 0,22 micras (Pall Life Sciences, filtro de jeringa Acrodisc de 25 mm, con una membrana HT Tuffryn de 0,2 micras) utilizando una jeringa, y la Densidad Óptica (DO) se mide en un espectrómetro UV para determinar las unidades de DO de oligómero presente, así como para dispensar la muestra para su análisis. A continuación, las soluciones se colocan de nuevo en viales Wheaton para su liofilización.

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

Método B de síntesis de PMO: uso de anclaje nitrocarboxifenilpropilo (NCP2).

Síntesis del anclaje NCP2:

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

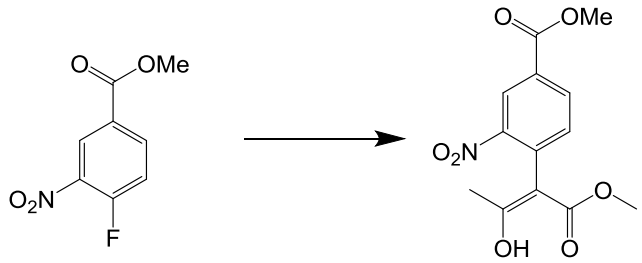


1

Se pueden añadir 12,7 kg de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico, 40 kg de metanol y 2,82 kg de ácido sulfúrico concentrado a un matraz de 100 L. La mezcla se agita a reflujo (65 ºC) durante 36 horas. La mezcla de reacción se enfría hasta 0 ºC. Se pueden formar cristales a aproximadamente 38 ºC. La mezcla se mantiene a 0 ºC durante 4 horas y después se filtra en nitrógeno. El matraz de 100 L se lava y la masa retenida en el filtro se lava con 10 kg de metanol que se habían enfriado hasta 0 ºC. La masa sólida retenida en el filtro se seca en el embudo durante 1 hora, se transfiere a bandejas y se seca en un horno de vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante.

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

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

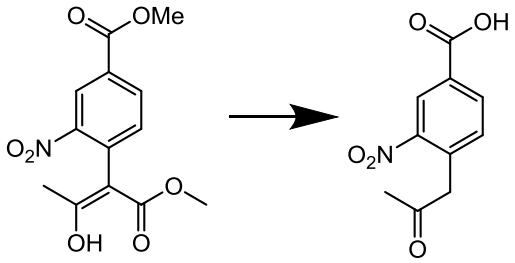


1 **2**

Se pueden añadir 3,98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (**1**) del paso anterior, 9,8 kg de DMF y 2,81 kg de acetoacetato de metilo a un matraz de 100 L. La mezcla se agita y se enfría hasta 0 ºC. Se añaden 3,66 kg de DBU durante

aproximadamente 4 horas mientras la temperatura se mantiene a 5 ºC o menos. La mezcla se agita 1 hora más. Se añade una solución de 8,15 kg de ácido cítrico en 37,5 kg de agua purificada mientras la temperatura de la reacción se mantiene a 15 ºC o menos. Después de la adición, la mezcla de reacción se agita 30 minutos más y después se filtra en nitrógeno. La masa húmeda retenida en el filtro se devuelve al matraz de 100 L junto con 14,8 kg de agua purificada. La suspensión densa se agita durante 10 minutos y a continuación se filtra. La masa húmeda se devuelve de nuevo al matraz de 100 L, se forma una suspensión densa con 14,8 kg de agua purificada durante 10 minutos y se filtra para obtener (Z)-4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de metilo crudo.

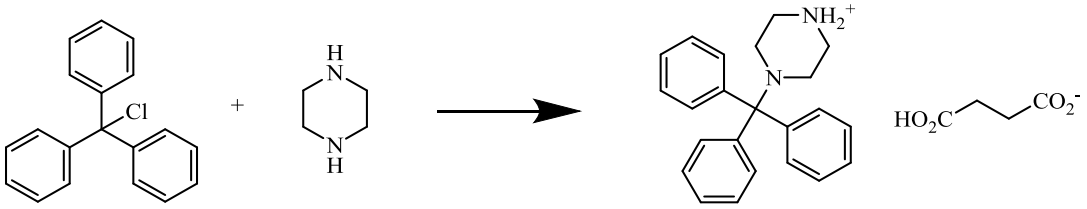
B. Ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico



2 3

El (Z)-4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de metilo crudo se puede cargar en un matraz de reacción de 100 L en nitrógeno. Se añaden 14,2 kg de 1,4-dioxano y después se agita. Se añade una solución de 16,655 kg de HCl concentrado y 13,33 kg de agua purificada (HCl 6 M) durante 2 horas mientras la temperatura de la mezcla de reacción se mantiene por debajo de 15 ºC. Cuando la adición se ha completado, la mezcla de reacción se calienta a reflujo (80 ºC) durante 24 horas, se enfría hasta temperatura ambiente y se filtra en nitrógeno. La masa sólida retenida en el filtro se tritura con 14,8 kg de agua purificada, se filtra, se tritura de nuevo con 14,8 kg de agua purificada y se filtra. El sólido se devuelve al matraz de 100 L con 39,9 kg de DCM y se somete a reflujo con agitación durante 1 hora. Se añaden 1,5 kg de agua purificada para disolver los sólidos restantes. La fase orgánica inferior se separa en un matraz de 72 L precalentado, a continuación se devuelve a un matraz de 100 L seco y limpio. La solución se enfría hasta 0 ºC, se mantiene durante 1 hora, a continuación se filtra. La masa sólida retenida en el filtro se lava dos veces, cada una con una solución de 9,8 kg de DCM y 5 kg de heptano, después se seca en el embudo. El sólido se transfiere a bandejas y se seca hasta un peso constante de 1,855 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico.

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

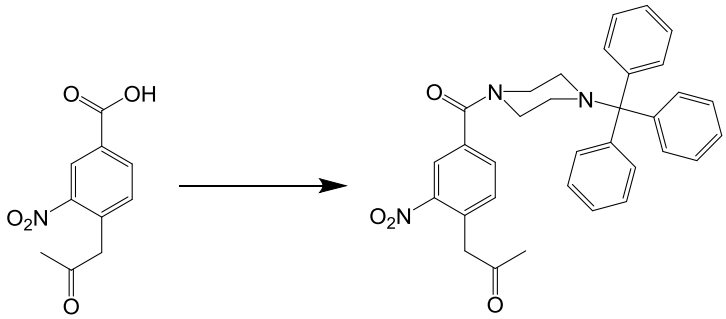


Se pueden cargar 1,805 kg de cloruro de trifenilmetilo y 8,3 kg de tolueno (solución de TPC) en un matraz encamisado de 72 L en nitrógeno. La mezcla se agita hasta que se disuelven los sólidos. Se añaden 5,61 kg de piperazina, 19,9 kg de tolueno y 3,72 kg de metanol en nitrógeno a un matraz de reacción encamisado de 100 L. La mezcla se agita y se enfría hasta 0 ºC. La solución de TPC se añade lentamente durante 4 horas en porciones, mientras la temperatura de reacción se mantiene a 10 ºC o menos. La mezcla se agita durante 1,5 horas a 10 ºC, después se deja calentar hasta 14 ºC. Se pueden cargar 32,6 kg de agua purificada al matraz de 72 L, a continuación se transfieren al matraz de 100 L mientras la temperatura interna del lote se mantiene a 20 ± 5 °C. Se deja que las fases se separen y la fase acuosa inferior se separa y se almacena. La fase orgánica se extrae tres veces con 32 kg de agua purificada cada una y las fases acuosas se separan y se combinan con la solución acuosa almacenada.

La fase orgánica restante se enfría hasta 18 ºC y se añade lentamente una solución de 847 g de ácido succínico en 10,87 kg de agua purificada en porciones a la fase orgánica. La mezcla se agita durante 1,75 horas a 20 ± 5 °C. La mezcla se filtra y los sólidos se lavan con 2 kg de TBME y 2 kg de acetona, y a continuación se secan en el embudo. La masa retenida en el filtro se tritura dos veces con 5,7 kg cada una de acetona y se filtra y se lava con 1 kg de acetona entre trituraciones. El sólido se seca en el embudo, a continuación se transfiere a bandejas, y se seca en un horno de vacío a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante.

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

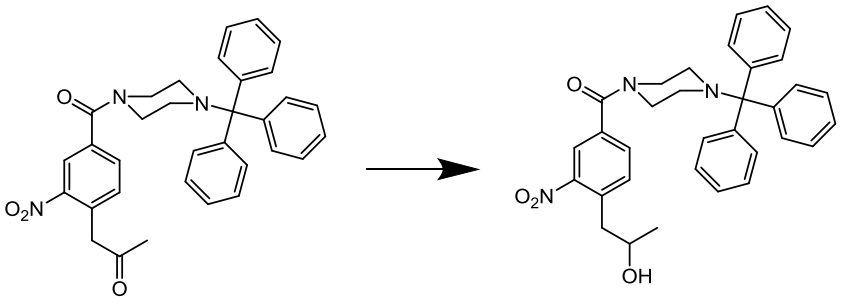
A. Preparación de 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazino-1-carbonil)fenil)propan-2-ona



3 4

Se pueden cargar 2 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico (**3**), 18,3 kg de DCM y 1,845 kg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl) en nitrógeno en un matraz encamisado de 100 L. La solución se agita hasta que se forma una mezcla homogénea. Se añaden 3,048 kg de NTP durante 30 minutos a temperatura ambiente y se agita durante 8 horas. Se añaden 5,44 kg de agua purificada a la mezcla de reacción y se agita durante 30 minutos. Se deja que las fases se separen y la fase orgánica inferior que contiene el producto se drena y se almacena. La fase acuosa se extrae dos veces con 5,65 kg de DCM. Las fases orgánicas combinadas se lavan con una solución de 1,08 kg de cloruro sódico en 4,08 kg de agua purificada. La fase orgánica se seca en 1,068 kg de sulfato sódico y se filtra. El sulfato sódico se lava con 1,3 kg de DCM. Se forma una suspensión densa de las fases orgánicas combinadas con 252 g de gel de sílice y se filtra a través de un embudo de filtro que contiene un lecho de 252 g de gel de sílice. El lecho de gel de sílice se lava con 2 kg de DCM. Las fases orgánicas combinadas se evaporan en un evaporador rotatorio, y después se añaden 4,8 kg de THF al residuo y se evaporan en el evaporador rotatorio hasta que se alcanzan 2,5 volúmenes de la 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazino-1-carbonil)fenil)propan-2-ona cruda en THF.

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

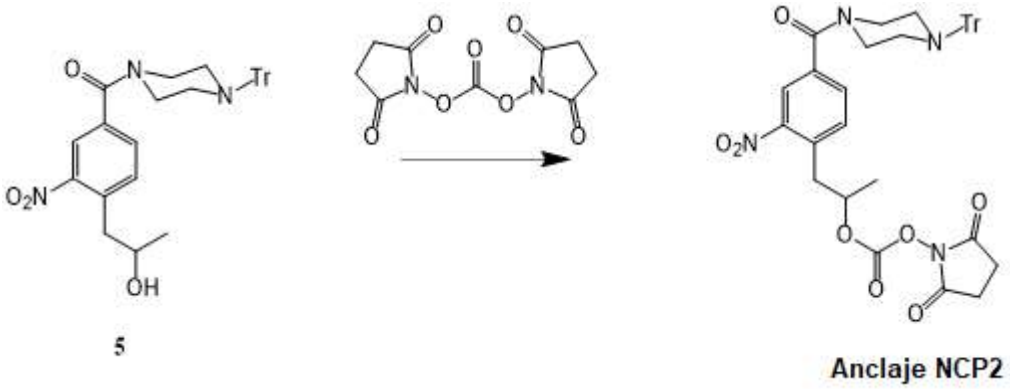


4 **5**

Se pueden cargar 3600 g de compuesto **4** del paso previo y 9800 g de THF en nitrógeno en un matraz encamisado de 100 L. La solución agitada se enfría hasta ≤ 5 °C. La solución se diluye con 11 525 g de etanol y 194 g de borohidruro sódico durante aproximadamente 2 horas a ≤ 5 °C. La mezcla de reacción se agita 2 horas más a ≤ 5 °C. La reacción se desactiva con una solución de 1,1 kg de cloruro amónico en 3 kg de agua mediante adición lenta para mantener la temperatura a ≤ 10 °C. La mezcla de reacción se agita 30 minutos más, se filtra para eliminar los compuestos inorgánicos, se vuelve a cargar en un matraz encamisado de 100 L y se extrae con 23 kg de DCM. La fase orgánica se separa y la fase acuosa se extrae dos veces más con 4,7 kg de DCM

cada una. Las fases orgánicas combinadas se lavan con una solución de 800 g de cloruro sódico en 3 kg de agua, después se secan en 2,7 kg de sulfato sódico. La suspensión se filtra y la masa retenida en el filtro se lava con 2 kg de DCM. Los filtrados combinados se concentran hasta 2,0 volúmenes, se diluyen con 360 g de acetato de etilo y se evaporan. El producto crudo se carga en una columna de gel de sílice de 4 kg de sílice empaquetada con DCM en nitrógeno y se eluye con 2,3 kg de acetato de etilo en 7,2 kg de DCM. Las fracciones combinadas se evaporan y el residuo se recoge en 11,7 kg de tolueno. La solución de tolueno se filtra y la masa retenida en el filtro se lava dos veces con 2 kg de tolueno cada una. La masa retenida en el filtro se seca hasta alcanzar un peso constante.

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



Se pueden cargar 4,3 kg de compuesto **5** (peso ajustado basándose en el tolueno residual por ^{1}H RMN; todos los reactivos en adelante se gradúan en consecuencia) y 12,7 kg de piridina en un matraz encamisado de 100 L en nitrógeno. Se añaden 3,160 kg de DSC (78,91 % en peso por ^{1}H RMN) a este mientras la temperatura interna se mantiene a ≤ 35 °C. La mezcla de reacción se deja madurar durante aproximadamente 22 horas a temperatura ambiente y a continuación se filtra. La masa retenida en el filtro se lava con 200 g de piridina. En dos lotes, que comprenden cada uno ½ del volumen de filtrado, se puede cargar lentamente el lavado de filtrado en un matraz encamisado de 100 L que contiene una solución de 11 kg de ácido cítrico y 50 kg de agua, y se agita durante 30 minutos para permitir la precipitación de un sólido. El sólido se recoge con un embudo de filtro, se lava dos veces con 4,3 kg de agua por lavado y se seca en el embudo de filtro al vacío.

Los sólidos combinados pueden cargarse en un matraz encamisado de 100 L y disolverse en 28 kg de DCM y lavarse con una solución de 900 g de carbonato potásico en 4,3 kg de agua. Después de 1 hora, se permite que las fases se separen y la fase

acuosa se elimina. La fase orgánica se lava con 10 kg de agua, se separa y se seca en 3,5 kg de sulfato sódico. El DCM se filtra, se evapora y se seca al vacío hasta obtener 6,16 kg de anclaje NCP2.

Síntesis de resina cargada con anclaje NCP2

Se pueden cargar aproximadamente 52 L de NMP y 2300 g de resina de aminometilpoliestireno en un reactor de síntesis en fase sólida de 75 L con una llave de Teflón. La resina se agita en el NMP para que se expanda por absorción de disolvente durante aproximadamente 2 horas y después se drena. La resina se lava dos veces con 4 L de DCM por lavado, después dos veces con 39 L de solución de neutralización por lavado, después dos veces con 39 L de DCM por lavado. La solución de anclaje NCP2 se añade lentamente a la solución de resina en agitación, se agita durante 24 horas a temperatura ambiente y se drena. La resina se lava cuatro veces con 39 L de NMP por lavado y seis veces con 39 L de DCM por lavado. La resina se trata y se agita con ½ de la solución de rematado de dicarbonato de dietilo (DEDC) durante 30 minutos, se drena y se trata y agita con la 2.ª mitad de la solución de rematado de DEDC durante 30 minutos y se drena. La resina se lava seis veces con 39 L de DCM por lavado y a continuación se seca en un horno hasta un peso constante de 3573,71 g de Resina cargada con anclaje.

Preparación de oligómero morfolino utilizando anclaje NCP2

Síntesis en fase sólida de 50 L de sustancia farmacológica cruda de PMO

1. Materiales

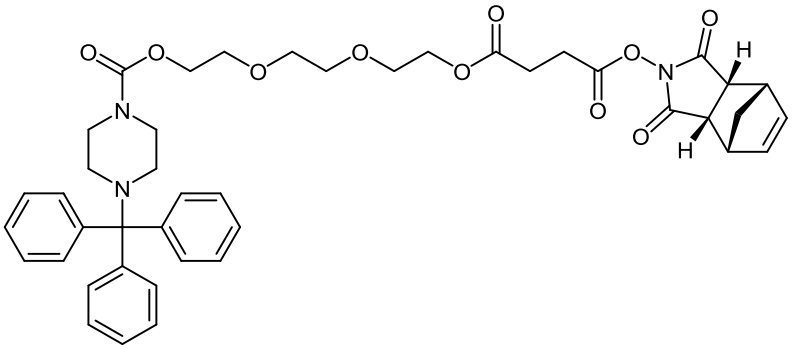
Tabla 2: Materiales de partida

Nombre del material	Nombre químico	Número CAS	Fórmula química	Peso molecular
Subunidad A activada	Éster *N*,*N*-dimetil-[6-[6-(benzoilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico del ácido fosforamidoclorhídrico	1155373-30-0	$C_{38}H_{37}ClN_7O_4P$	722,2
Subunidad C activada	Éster *N*,*N*-dimetil-[6-[4-(benzoilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico del ácido fosforamidoclorhídrico	1155373-31-1	$C_{37}H_{37}ClN_5O_5P$	698,2
Subunidad DPG activada	Éster 2,2-dimetil-4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino)fosfinil]oxi]meti	1155309-89-9	$C_{51}H_{53}ClN_7O_7P$	942,2

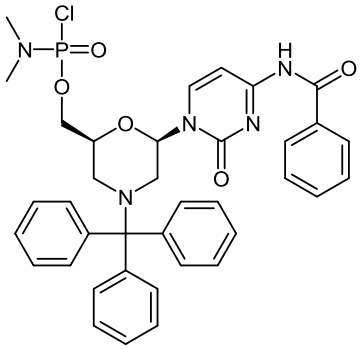
	l]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenílico del ácido propanoico			
Subunidad T activada	Éster *N*,*N*-dimetil-[6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico del ácido fosforamidoclorhídrico	1155373-34-4	$C_{31}H_{34}ClN_4O_5P$	609,1
Cola EG3 activada	Éster 1-[3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il] 4-[2-[2-[2-[[[4-(trifenilmetil)-1-piperazinil]carbonil]oxi]etoxi]etoxi]etílico] del ácido butanodioico	1380600-06-5	$C_{43}H_{47}N_3O_{10}$	765,9

Estructuras químicas de los materiales de partida:

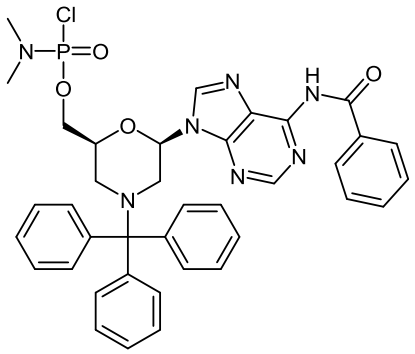
A. Cola EG3 activada



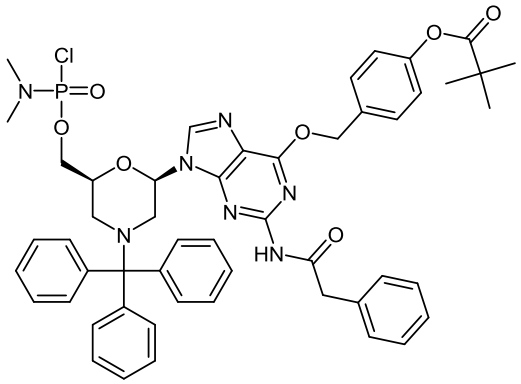
B. Subunidad C activada (Para la preparación, remítase a la Patente de EE. UU. N.º 8 067 571)



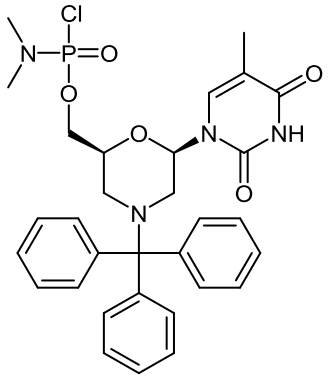
C. Subunidad A activada (Para la preparación, remítase a la Patente de EE. UU. N.º 8 067 571)



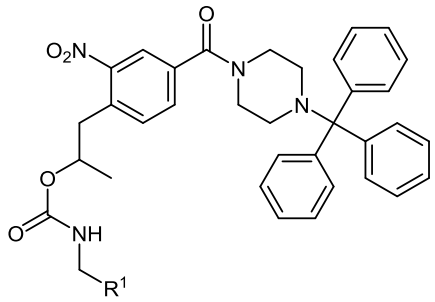
D. Subunidad DPG activada (Para la preparación, remítase al documento WO 2009/064471)



E. Subunidad T activada (Para la preparación, remítase al documento WO 2013/082551)



F. Resina cargada con anclaje



donde R^1 es un medio de soporte

Tabla 3: Descripción de soluciones para la síntesis de oligómeros en fase sólida de la sustancia farmacológica cruda de PMO

Nombre de la solución	Composición de la solución
Solución de anclaje NCP2	37,5 L de NMP y 1292 g de anclaje NCP2
Solución de rematado de DEDC	4,16 L de dicarbonato de dietilo (DEDC), 3,64 L de NEM y 33,8 L de DCM
Solución de CYTFA	2,02 kg de 4-cianopiridina, 158 L de DCM, 1,42 L de TFA, 39 L de TFE y 2 L de agua purificada
Solución de neutralización	35,3 L de IPA, 7,5 L de DIPEA y 106,5 L de DCM
Solución de escisión	1530,04 g de DTT, 6,96 L de NMP y 2,98 L de DBU

2. Síntesis de la sustancia farmacológica cruda de PMO

A. Expansión de la resina por absorción de disolvente

Puede cargarse una alícuota de 750 g de resina cargada con anclaje y 10,5 L de NMP en un reactor silanizado de 50 L y agitarse durante 3 horas. El NMP se drena y la resina cargada con anclaje se lava dos veces con 5,5 L cada una de DCM y dos veces con 5,5 L cada una de TFE/DCM al 30 %.

B. Ciclo 0: acoplamiento de la cola EG3

La resina cargada con anclaje se lava tres veces con 5,5 L cada una de TFE/DCM al 30 % y se drena, se lava con 5,5 L de solución de CYTFA durante 15 minutos y se drena, y de nuevo se lava con 5,5 L de solución de CYTFA durante 15 minutos sin drenar, en la cual pueden cargarse 122 mL de NEM/DCM 1:1 y la suspensión puede agitarse durante 2 minutos y drenarse. La resina se lava dos veces

con 5,5 L de solución de neutralización durante 5 minutos y se drena, después dos veces con 5,5 L cada una de DCM y se drena. Puede cargarse una solución de 706,2 g de Cola EG3 activada y 234 mL de NEM en 3 L de DMI en la resina y agitarse durante 3 horas a TA y drenarse. La resina se lava dos veces con 5,5 L cada una de solución de neutralización durante 5 minutos para cada lavado, y después una vez con 5,5 L de DCM y se drena. Puede cargarse una solución de 374,8 g de anhídrido benzoico y 195 mL de NEM en 2680 mL de NMP y agitarse durante 15 minutos y drenarse. La resina se agita con 5,5 L de solución de neutralización durante 5 minutos, a continuación se lava una vez con 5,5 L de DCM y dos veces con 5,5 L cada una de TFE/DCM al 30 %. La resina se suspende en 5,5 L de TFE/DCM al 30 % y se mantiene durante 14 horas.

C. Ciclos de acoplamiento de subunidades 1-**n**

Tabla 4 - Acoplamiento de subunidades básicas generales

N.º de ciclo: Subunidad (SU)	Tratamiento previo al acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Tratamiento posterior al acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	TFE/DCM al 30 % Lavado	Solución de CYTFA[1]	Solución de neutralización	DCM Lavado	Cantidad SU (g) NEM (L) DMI (L)	Tiempo de acoplamiento a TA (h)	DCM Lavado	TFE/DCM al 30 % Lavado
1:C	5,5 L	a) 5,5 L b) 5,5 L, 122 mL	3x5,5 L	5,5 L	536,7 g; 195 mL de NEM; 3,2 L de DMI	5	5,5 L	2x5,5L

[1] mL indica la cantidad de NEM/DCM 1:1

i. Tratamientos previos al acoplamiento

Antes de cada ciclo de acoplamiento, la resina se: 1) lava con TFE/DCM al 30 %; 2) a) se trata con solución de CYTFA durante 15 minutos y se drena y b) se trata con solución de CYTFA durante 15 minutos a la cual se añade NEM/DCM 1:1, se agita y se

drena, 3) se agita tres veces con solución de neutralización y 4) se lava dos veces con DCM.

ii. Tratamientos posteriores al acoplamiento

Después de drenar cada solución de subunidades, la resina se: 1) lava con DCM; y 2) se lava dos veces con TFE/DCM al 30 %. Si la resina se mantiene durante un periodo de tiempo antes del siguiente ciclo de acoplamiento, el segundo lavado con TFE/DCM no se drena y la resina se retiene en dicha solución de lavado con TFE/DCM.

iii. Ciclos de acoplamiento de subunidades activadas

Cada ciclo de acoplamiento se lleva a cabo tal como se ha descrito de forma general para el acoplamiento del monómero C inicial (citosina) en la Tabla 2 para cada subunidad que contiene bases.

iv. Lavado con IPA final

Después de llevar a cabo el paso de acoplamiento final, la resina se lava 8 veces con 19,5 L cada una de IPA, y se seca al vacío a temperatura ambiente durante aproximadamente 63,5 horas hasta un peso seco de 5579,8 g.

C. Escisión

La sustancia farmacológica cruda de PMO unida a la resina anterior se divide en dos lotes, cada lote se trata de la siguiente manera. Un lote de 2789,9 g de resina se: 1) agita con 10 L de NMP durante 2 h, después el NMP se drena; 2) se lava tres veces con 10 L cada una de TFE/DCM al 30 %; 3) se trata con 10 L de solución de CYTFA durante 15 minutos; y 4) se trata con 10 L de solución de CYTFA durante 15 minutos a la cual se añaden después 130 mL de NEM/DCM 1:1 y se agita durante 2 minutos y se drena. La resina se trata tres veces con 10 L cada una de solución de neutralización, se lava seis veces con 10 L de DCM, y ocho veces con 10 L cada una de NMP. La resina se trata con una solución de escisión de 1530,4 g de DTT y 2980 DBU en 6,96 L de NMP durante 2 horas para desprender la sustancia farmacológica cruda de PMO de la resina. La solución de escisión se drena y se mantiene en un recipiente separado. El reactor y la resina se lavan con 4,97 L de NMP que se combinan con la solución de escisión.

D. Desprotección

La solución de escisión y el lavado de NMP combinados se transfieren a un recipiente a presión al cual se añaden 39,8 L de NH_4OH ($NH_3 \bullet H_2O$) que se preenfría hasta una temperatura de -10 °C a -25 °C en un congelador. El recipiente a presión se cierra herméticamente y se calienta hasta 45 °C durante 16 horas, a continuación se deja enfriar hasta 25 °C. Esta solución de desprotección que contiene la sustancia

farmacológica cruda de PMO se diluye 3:1 con agua purificada y el pH se ajusta hasta 3,0 con ácido fosfórico 2 M, a continuación se ajusta hasta pH 8,03 con NH_4OH.

E. Purificación de la sustancia farmacológica cruda de PMO

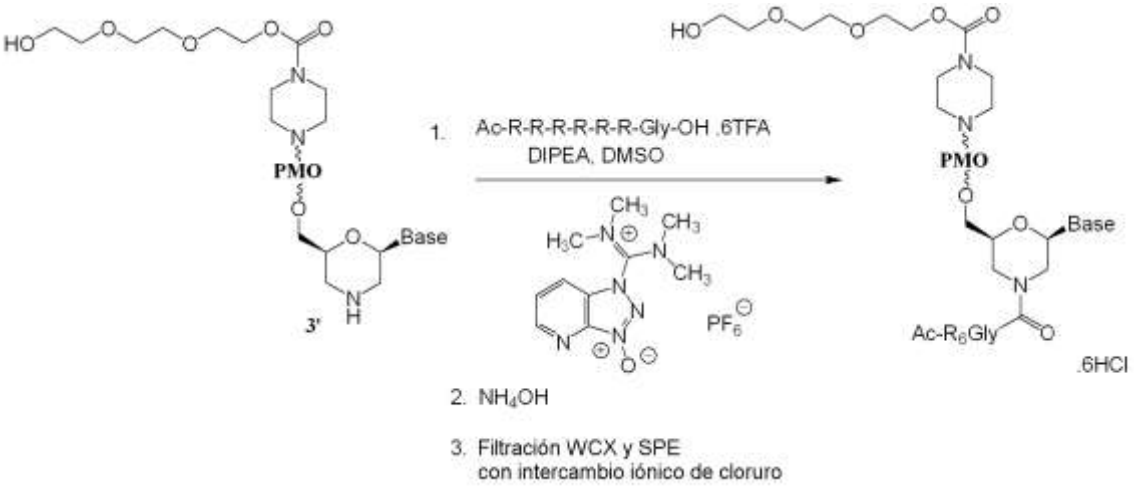
La solución de desprotección de la parte D anterior, que contiene la sustancia farmacológica cruda de PMO, se carga en una columna de resina de intercambio aniónico ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) y se eluye con un gradiente de un 0-35 % de B en 17 volúmenes de columna (Tampón A: hidróxido sódico 10 mM, Tampón B: cloruro sódico 1 M en hidróxido sódico 10 mM) y las fracciones de pureza aceptable (C18 y SCX HPLC) se combinan para obtener una solución de producto farmacológico purificado.

La solución de sustancia farmacológica purificada se desala y se liofiliza para obtener la sustancia farmacológica de PMO purificada.

Tabla 5. Acrónimos

Acrónimo	**Nombre**
CYTFA	Ácido trifluoroacético 4-cianopiridina
CPP	Péptido que penetra en las células
DBU	1,8-Diazabicicloundec-7-eno
DCM	Diclorometano
DEDC	Dicarbonato de dietilo
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMI	1,3-Dimetil-2-imidazolidinona
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DTT	DL-Ditiotreitol
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IPA	Alcohol isopropílico
PM	Peso molecular
NEM	N-Etilmorfolino
NMP	N-Metil-2-pirrolidona
SAX	Intercambio aniónico intenso
SCX	Intercambio catiónico intenso
SPE	Extracción en fase sólida
TA	Temperatura ambiente
TFA	Ácido 2,2,2-trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol

Conjugación de CPP ("R6Gly" se divulga como SEQ ID NO: 11*)*



Procedimientos analíticos: los espectros de desorción/ionización LÁSER asistidos por una matriz con detección de masas por tiempo de vuelo (MALDI-TOF-MS) se pueden registrar en un instrumento Bruker AutoflexTM Speed, utilizando una matriz de ácido sinapínico (SA). La SCX-HPLC se puede llevar a cabo en un sistema Thermo Dionex UltiMate 3000 equipado con un detector de matriz de diodos 3000 y una columna ProPacTM SCX-20 (250 x 4 mm) utilizando una tasa de flujo de 1,0 mL/min (pH = 2; temperatura de la columna 30 ºC). Las fases móviles pueden ser **A** (25 % de acetonitrilo en agua que contiene H_3PO_4 24 mM) y **B** (25 % de acetonitrilo en agua que contiene KCl 1 M y H_3PO_4 24 mM). Se puede emplear un gradiente de elución: 0 min, 35 % de **B**; 2 min, 35 % de **B**; 22 min, 80 % de **B**; 25 min, 80 % de **B**; 25,1 min, 35 % de **B**; 30 min, 35 % de **B**.

Se añaden hexatrifluoroacetato de Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH (SEQ ID NO: 11) (614,7 mg, 0,354 mmol) y hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridinio 3-óxido (HATU, 134,4 mg, 0,354 mmol) y sulfóxido de dimetilo (DMSO, 20 mL) a una mezcla del PMO (nuevamente secado mediante liofilización durante dos días). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 3 minutos, después se añade *N*,*N*-diisopropiletilamina (DIPEA, 68,5 mg, 0,530 mmol). Después de 5 minutos, la mezcla turbia pasa a ser una solución transparente. La reacción se puede monitorizar por SCX-HPLC. Después de 2 horas, se añaden 20 mL de solución de hidróxido amónico al 10 % (2,8 % de NH_3*H_2O). La mezcla se agita a temperatura ambiente durante 2 horas más. La reacción se termina con la adición de 400 mL de agua. Se añade trifluoroetanol (2,0 mL) a la solución.

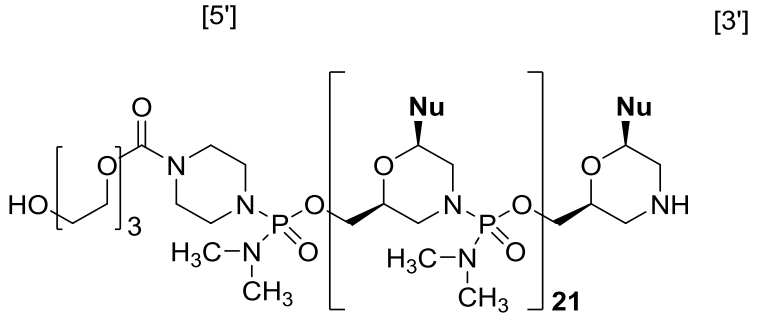
La solución se divide en dos partes y cada parte se puede purificar con una columna WCX (10 g de resina por columna). Cada columna WCX se lava en primer lugar

con un 20 % de acetonitrilo en agua (v/v) para eliminar el material de partida PMO. Los lavados (225 mL para cada columna) se pueden detener cuando el análisis del espectro de masas MALDI-TOF muestra la ausencia de señal de PMO. Cada columna se lava después con agua (100 mL por columna). El producto deseado se puede eluir utilizando guanidina HCl 2,0 M (140 mL para cada columna). Las soluciones purificadas se combinan y luego se dividen en dos partes y cada una se desala con una columna SPE (10 g de resina para cada columna).

Las columnas SPE se pueden lavar en primer lugar con solución de NaCl acuosa 1,0 M (100 mL para cada columna) para generar la forma de sal de hexaclorhidrato. Cada columna SPE se lava después con agua (200 mL para cada columna). El producto desalado final se puede eluir utilizando un 50 % de acetonitrilo en agua (v/v, 150 mL para cada columna). El acetonitrilo se puede eliminar por evacuación a presión reducida. La solución acuosa resultante se puede liofilizar para obtener el producto deseado como una sal de hexaclorhidrato.

Ejemplo 1: PMO

Utilizando los métodos de síntesis de PMO descritos anteriormente, PMO#1, PMO#2 y PMO#3 se sintetizaron de la siguiente manera:



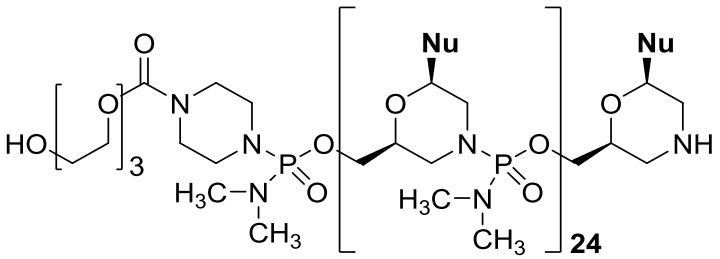
PMO#1

donde cada Nu de 1 a 22 y de 5’ a 3’ es H50D(+04-18) (SEQ ID NO: 1):

N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu
1	G	6	C	11	A	16	T	21	G
2	G	7	C	12	T	17	A	22	C
3	G	8	A	13	A	18	C		
4	A	9	G	14	C	19	A		

5	T	10	T	15	T	20	G		

[5'] [3']

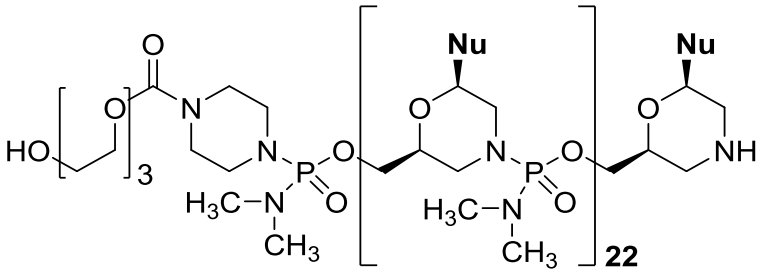


PMO#2

donde cada Nu de 1 a 25 y de 5’ a 3’ es H50D(+07-18) (SEQ ID NO: 2):

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

[5'] [3']

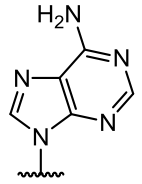
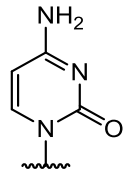
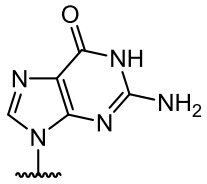
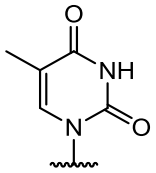


PMO#3

donde cada Nu de 1 a 23 y de 5’ a 3’ es H50D(+07-16) (SEQ ID NO: 3):

N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu	N.º de posición de 5’ a 3’	Nu
1	G	6	A	11	A	16	C	21	T
2	A	7	G	12	C	17	A	22	C
3	T	8	T	13	T	18	G	23	C

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

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

El PMO#1 (SEQ ID NO: 1) proporcionó un producto con características de solubilidad que eran demasiado limitadas para permitir la formulación de productos farmacológicos, mientras que el PMO#2 (SEQ ID NO: 2) proporcionó un producto que no se pudo fabricar con suficiente rendimiento y pureza.

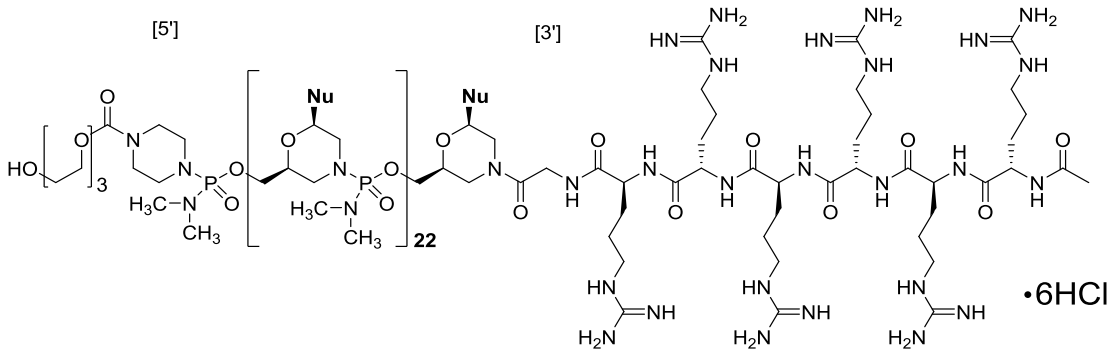
Al contrario que la síntesis de PMO#1 y PMO#2, la síntesis de PMO#3 (que difiere solamente en 2 bases del extremo 5' de PMO#2) no dio problemas de solubilidad ni purificación, lo que permitió la síntesis posterior de PPMO#3 a partir de PMO#3 (Ejemplo 2 - a continuación).

Secuencia dirigida (5'-3')	**SEQ ID NO:**	**Problemas de fabricación de PMO:**
GGGATCCAGTATACTTACAGGC	1	Solubilidad: el PMO crudo precipita tras el almacenamiento, por lo que presenta solubilidad y estabilidad en solución limitadas y esto hace que la síntesis de PPMO posterior no sea factible y para que sirva como candidato a producto farmacológico.
GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	2	Purificación: el PMO crudo no se pudo purificar hasta un nivel de pureza apropiado requerido para la síntesis posterior de PPMO y para que sirva como candidato a producto farmacológico.
GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	Ninguno (91 % de pureza; se disuelve en agua)

Se utilizó un proceso similar para sintetizar PMO#4, PMO#5, PMO#6, PMO#7, PMO#8 y PMO#9.

Ejemplo 2: PPMO#3

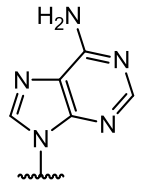
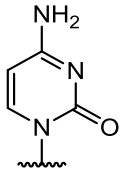
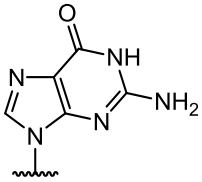
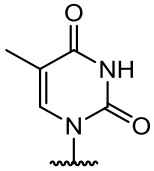
Utilizando el protocolo descrito anteriormente, se sintetizó PPMO#3 a partir de PMO#3 (SEQ ID NO: 3):



PPMO#3

donde cada Nu de 1 a 23 y de 5’ a 3’ es SEQ ID NO: 3:

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

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

Ejemplo 3: salto del exón 50 *in vitro*

Dos compuestos dirigidos al exón 50 de la distrofina humana (DMD), tal como se describen en la Tabla a continuación, el PMO#3 y el PPMO#3, ambos de los cuales contienen la misma secuencia, se evaluaron en cuanto al salto del exón 50 de DMD en miotubos humanos sanos.

Secuencias de PMO#3 y PPMO#3:

Nombre	Secuencia dirigida (TS)	SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	H

PPMO#3	GATCCAGTATACTTACAGGCTCC	3	EG3	-G-R_6 (SEQ ID NO: 11)

De forma específica, los mioblastos humanos sanos (pasaje 5-6, SKB-F-SL adquiridos de Zen-Bio, Inc.) se cultivaron para alcanzar un 80-90 % de confluencia en medio SKM-M antes del inicio de la diferenciación incubando en un medio con poco suero (SKM-D, Zen-Bio, Inc.). Cinco días después de la diferenciación, se incubaron los miotubos maduros con los compuestos anteriores con varias concentraciones (es decir, 40 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2,5 µm y 1,25 µm). Después de noventa y seis horas de incubación, los miotubos se lavaron con PBS y se lisaron con el tampón RLT en el kit RNeasy Micro (N.º de Cat. 74004, Qiagen) suplementado con un 1 % de β-mercaptoetanol. Se aislaron los ARN totales según las recomendaciones del fabricante, salvo por la utilización de 20 µL de agua exenta de RNasa para eluir el ARN.

Para determinar el salto del exón 50 de DMD con ambos compuestos, se llevó a cabo una RT-PCR de punto final en un paso. La síntesis de ADNc y amplificación de PCR se llevó a cabo utilizando 100 ng de ARN total, cebadores con especificidad génica y un Sistema de RT-PCR en un paso SuperScript III con ADN Polimerasa Platinum *Taq* (N.º de Cat. 12574-026, Invitrogen). Los cebadores con especificidad génica se diseñaron para que se dirigiesen a los exones 49 y 52 de DMD humana (cebador directo: CCA GCC ACT CAG CCA GTG AAG (SEQ ID NO: 12); cebador inverso: CGA TCC GTA ATG ATT GTT CTA GCC(SEQ ID NO: 13)). La síntesis de ADNc y la amplificación por PCR se llevaron a cabo utilizando termocicladores en tiempo real BioRad CFX96 utilizando el programa mostrado en la Tabla 6. La expresión de los productos de PCR con salto y sin salto se evaluó cargando 22 µL de producto de PCR en el LabChip de alcance extenso de ADN de un sistema LabChip GX preparado con el reactivo de ADN 1K (N.º de cat. 760517 y CLS760673, Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de salto del exón 50 de DMD se calcula como el porcentaje de la molaridad (nmol/L) para la banda con salto del exón 50 en comparación con la suma de las molaridades para las bandas con salto y sin salto.

Se utilizó la prueba t de Student no apareada de dos colas (homoscedástica) para evaluar si las medias de los 2 grupos son estadísticamente diferentes entre sí en cada dosis. Un valor de $P < 0,05$ se considera estadísticamente significativo.

Tabla 6. Programa de termociclador utilizado para amplificar amplicones de DMD con o sin salto del exón 50.

Paso	Temperatura	Tiempo

1. Transcripción inversa	55 °C	30 min
2. Inactivación de transcriptasa inversa	94 °C	2 min
3. Desnaturalización	94 °C	45 s
4. Hibridación	59 °C	45 s
5. Extensión	68 °C	1 min
6. Repetición del paso 3-4	45 ciclos	
7. Extensión final	68 °C	10 min
8. Almacenamiento	4 °C	∞

Los resultados, que muestran que la PPMO#3 aumenta significativamente el salto del exón 50 de DMD en comparación con PMO#3, se presentan en la tabla a continuación (como la relación de salto de PPMO#3 frente a PMO#).

Tabla 7. Porcentaje de salto del exón 50 de DMD con PMO#3 y PPMO#3 en miotubos humanos.

Compuesto/	Salto de exones relativo					
Dosis (µm)	1,25	2,5	5	10	20	40
PMO#3	1	1	1	1	1	1
PPMO#3	2,6	3,2	3,0	2,4	2,1	1,9

Los datos en la Tabla 7 anterior muestran que resultados de salto del exón 50 mayores en los miotubos cuando las células se tratan con PPMO#3 en comparación con PMO#3 en todas las concentraciones. Esta mejora se puede demostrar adicionalmente en una prueba comparativa *in vivo* tal como el estudio de primates no humanos (NHP) del Ejemplo 4 cuando los NHP se tratan con PPMO#3 o PMO#3 y el salto del exón 50 se mide en varios tejidos musculares relevantes (remítase al Ejemplo 4 para consultar los detalles).

Ejemplo 4: salto del exón 50 en NHP

Para demostrar adicionalmente la eficacia de salto de exones de los oligómeros antisentido PPMO se utilizan primates no humanos. Específicamente, a los monos cinomolgos que tienen tejidos musculares intactos se les inyecta por vía intravenosa PPMO#3 (Ejemplo 2), PMO#3 (Ejemplo 1) o solución salina.

Los animales son observados durante todo el estudio, que incluye observaciones clínicas (por ejemplo, evaluación de la piel y el pelo, efectos respiratorios) y medidas de peso corporal. Se toman muestras de sangre y orina al menos antes de que comience la prueba, y 24 horas después de la primera dosis y la última dosis (cuando proceda).

En cada necropsia programada, o eutanasia *in extremis*, se toman y se congelan instantáneamente secciones del diafragma, músculo liso del duodeno, esófago y aorta, cuádriceps, deltoides, bíceps y corazón. Se determina el porcentaje de salto del exón 50 utilizando RT-PCR tal como se ha descrito anteriormente.

Ejemplo 5: salto del exón 50 con PMO *in vitro*

Se preparó una serie de PMO (SEQ ID NO 1-7; PMO#1 – #7) y se evaluó su eficiencia de salto del exón 50. De forma resumida, los mioblastos primarios humanos se cultivaron utilizando técnicas estándar. Los PMO liofilizados se resuspendieron en agua exenta de nucleasa para verificar la molaridad y las soluciones PMO se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se suministró un intervalo de dosis de PMO a células de tipo mioblasto (por ejemplo, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 y 20 µM) utilizando la nucleoporación según las instrucciones del fabricante y el kit P3 (Lonza) y se dejaron incubar durante la noche en un incubador a 37 ºC con un 5 % de CO_2 antes de la extracción del ARN. Se extrajo el ARN de las células tratadas con PMO utilizando el kit de aislamiento de ARN de 96 pocillos RNAspin de GE Healthcare y se sometió a RT-PCR utilizando técnicas estándar con cebadores que amplificaban los exones 49-52 de DMD humana. El salto se midió utilizando el bioanalizador Caliper LabChip y el % de salto de exón (es decir, la intensidad de las bandas del producto con salto de exón respecto al producto de PCR completo) se calculó con la ecuación: [producto con salto del exón 50/(suma de productos con salto del exón 50 y sin salto del exón 50)*100] y se calcularon los valores de CE50 basándose en el porcentaje de salto inducido con cada concentración. Tal como se muestra en la Tabla 8, los oligómeros PMO de la divulgación diseñados para dirigirse a las regiones aceptoras de corte y empalme o dadoras de corte y empalme del exón 50 proporcionaron salto del exón 50, proporcionando PMO#1, PMO#2 y PMO#3 los niveles más elevados de actividad de salto del exón 50 (CE_{50} < 1,0 µM).

Tabla 8.

SEQ ID NO:	Compuesto	Actividad (CE_{50} [(1)])
1	PMO#1 (+04-18)	****
2	PMO#2 (+07-18)	****
3	PMO#3 (+07-16)	****
4	PMO#4 (+07-17)	**
5	PMO#5 (-19+07)	**
6	PMO#6 (+07-15)	*

7	PMO#7 (-02+23)	*

(1) **** = CE_{50} < 1,0 µM; ** = CE_{50} 1,0 a 3,0 µM;

* = CE_{50} 3,0 µM o superior.

Se sobreentiende que la descripción detallada anterior y los ejemplos que la acompañan son meramente ilustrativos y no se deben considerar limitaciones al alcance de la invención, que está definida solamente por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes.

Varios cambios y modificaciones a las realizaciones divulgadas serán evidentes para los expertos en la técnica. Dichos cambios y modificaciones, que incluyen sin limitación los que se refieren a estructuras químicas, sustituyentes, derivados, intermedios, síntesis, composiciones, formulaciones o métodos de uso de la invención, se pueden llevar a cabo sin alejarse de su naturaleza o alcance.

LISTADO DE SECUENCIAS*

Descripción	PMO Identificador	PPMO Identificador	Secuencia (de 5' a 3' o de extremo N a extremo C)	SEQ ID NO
H50D(+04-18)	PMO#1	PPMO#1	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	1
H50D(+07-18)	PMO#2	PPMO#2	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	2
H50D(+07-16)	PMO#3	PPMO#3	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	3
H50D(+07-17)	PMO#4	PPMO#4	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	4
H50A(-19+07)	PMO#5	PPMO#5	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	5
H50D(+07-15)	PMO#6	PPMO#6	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	6
H50A(-02+23)	PMO#7	PPMO#7	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	7
H50D(+06-18)	PMO#8	PPMO#8	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	8

H50D(+07-20)	PMO#9	PPMO#9	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	9
R_6			RRRRRR	10
R_6G			RRRRRRG	11
Cebador directo de unión al exón 49 humano			CCAGCCACTCAGCC AGTGAAG	12
Cebador inverso de unión al exón 52 humano			CGATCCGTAATGAT TGTTCTAGCC	13
PMO-G	PMO-G	PPMO-G	GTTGCCTCCGGTTC TGAAGGTGTTC	14
$(RXR)_4$			RXRRXRRXRRXR	15
$(RFF)_3R$			RFFRFFRFFR	16
$(RXR)_4XB$			RXRRXRRXRRXRXB	17
$(RFF)_3RXB$			RFFRFFRFFRXB	18
$(RFF)_3RG$			RFFRFFRFFRG	19
R_5G			RRRRRG	20
R_5			RRRRR	21
Intrón 49 – EXÓN 50 – Intrón 50	atcttcaaagtgttaatcgaataagtaatgtgtatgcttttctgttaaagAGGAAGTTA GAAGATCTGAGCTCTGAGTGGAAGGCGGTAAACCGTTTAC TTCAAGAGCTGAGGGCAAA GCAGCCTGACCTAGCTCCTGGACTGACCACTATTGGAGCC Tg taagtatactggatcccattctctttggctctagctatttgttcaaaag			22

* Dependiendo de la química utilizada para unir las nucleobases, T puede ser Timina o Uracilo.

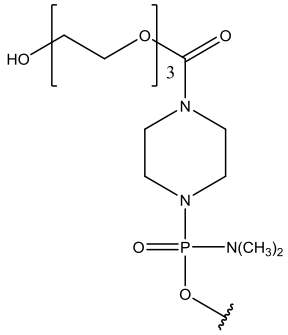
REIVINDICACIONES

1. Un oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, capaz de unirse a una diana seleccionada para inducir salto de exones en el gen de distrofina humano, donde el oligómero antisentido comprende una secuencia de bases que es complementaria respecto a una región diana del exón 50 del pre-ARNm de distrofina diseñado como un sitio de hibridación, donde la secuencia de bases y el sitio de hibridación se seleccionan entre:

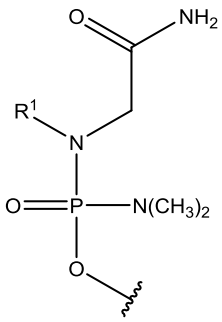
Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde T en cada SEQ ID NO: 1-9 es timina o uracilo.

2. El oligómero antisentido de la reivindicación 1, donde el oligómero antisentido contiene un resto **T** unido al extremo 5' del oligómero antisentido, donde el resto **T** se selecciona entre:



;



; y

;

y donde el oligómero antisentido está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células;

y donde el oligómero antisentido induce salto de exones en el gen de distrofina humano, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

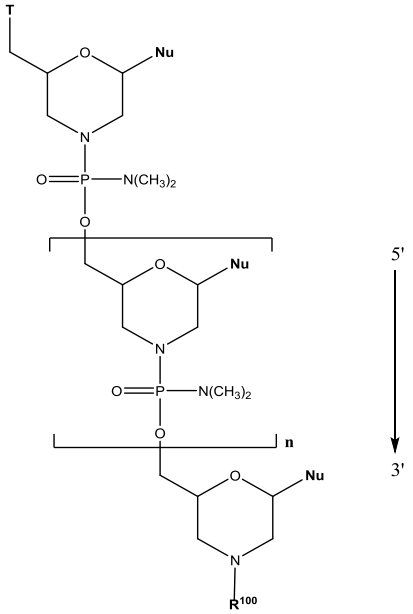
3. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde un péptido que penetra en las células está unido al extremo 3' del oligómero antisentido.

4. El oligómero antisentido de la reivindicación 3, donde el péptido que penetra en las células es un péptido rico en arginina.

5. El oligómero antisentido de la reivindicación 4, donde el péptido rico en arginina se selecciona del grupo constituido por –$(RXR)_4$-R^a (SEQ ID NO: 15), R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 16), -B-X-$(RXR)_4$-R^a (SEQ ID NO: 17), -B-X-R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 18), -GLY-R-$(FFR)_3$-R^a (SEQ ID NO: 19), -GLY-R_5-R^a (SEQ ID NO: 20), –R_5-R^a (SEQ ID NO: 21), -GLY-R_6-R^a (SEQ ID NO: 11) y –R_6-R^a (SEQ ID NO: 10), donde R^a se selecciona entre H, acilo, benzoílo y estearoílo, y donde R es arginina, X es ácido 6-aminohexanoico, B es β-alanina, F es fenilalanina y GLY (o G) es glicina.

6. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde las nucleobases del oligómero antisentido se unen a estructuras de anillos morfolino.

7. Un oligómero antisentido de acuerdo con la Fórmula (I):

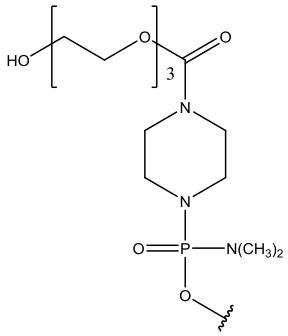


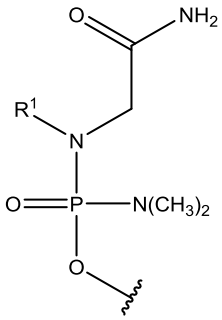
(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde:

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

T es un resto seleccionado entre:



; 

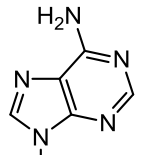
; y

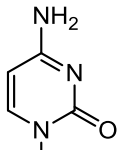
; y el –OH o –NH_2 distal del resto T está unido opcionalmente a un péptido que penetra en las células;

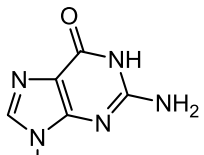
R^{100} es hidrógeno o un péptido que penetra en las células;

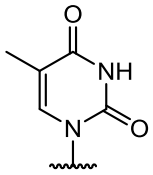
cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde A es 

, C es 

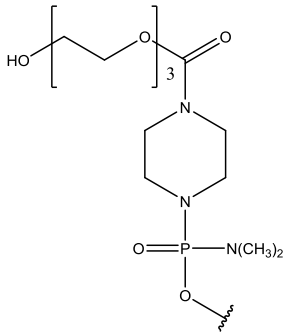
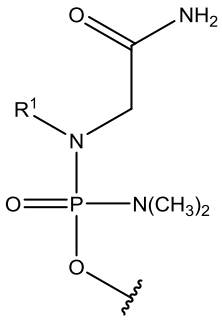
, G es 

y T es 

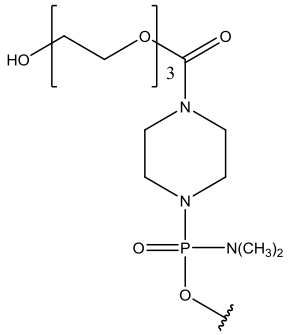
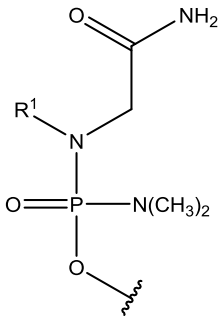
8. El oligómero antisentido de la reivindicación 7, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a la SEQ ID NO: 3.

9. El oligómero antisentido de la reivindicación 7 u 8, donde el oligómero antisentido contiene un péptido que penetra en las células.

10. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 7-9, donde **T** es un resto seleccionado entre:

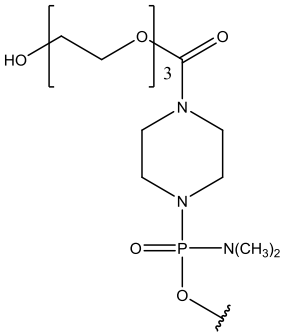


;
; y .

11. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 7-10, donde **T** es un resto seleccionado entre:



;
; y ; y

R^{100} es un péptido que penetra en las células.

12. El oligómero antisentido de la reivindicación 11, donde:

T es  y

R^{100} es un péptido que penetra en las células.

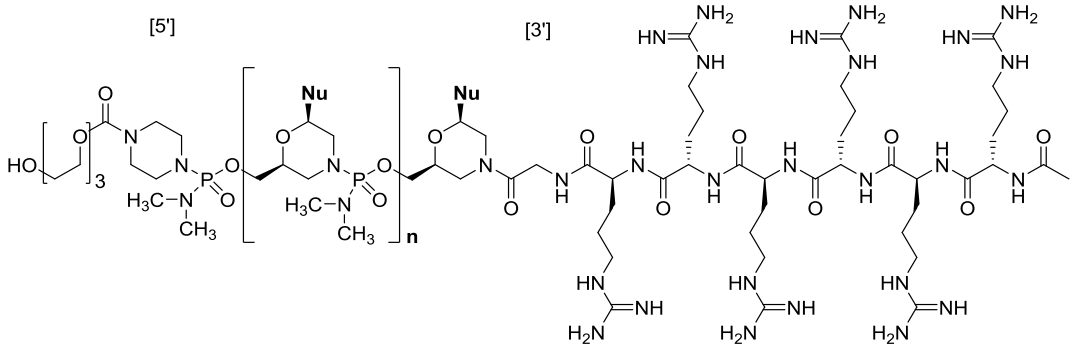
13. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 7-12, donde el péptido que penetra en las células es un péptido rico en arginina.

14. El oligómero antisentido de la reivindicación 13, donde el péptido rico en arginina se selecciona del grupo constituido por –(RXR)$_4$-R^a (SEQ ID NO: 15), R-(FFR)$_3$-R^a (SEQ ID NO: 16), -B-X-(RXR)$_4$-R^a (SEQ ID NO: 17), -B-X-R-(FFR)$_3$-R^a (SEQ ID NO: 18), -GLY-R-(FFR)$_3$-R^a (SEQ ID NO: 19), -GLY-R$_5$-R^a (SEQ ID NO: 20), –R$_5$-R^a (SEQ ID NO: 21), -GLY-R$_6$-R^a (SEQ ID NO: 11) y –R$_6$-R^a (SEQ ID NO: 10), donde R^a se selecciona entre H, acilo, benzoílo y estearoílo, y donde R es arginina, X es ácido 6-aminohexanoico, B es β-alanina, F es fenilalanina y GLY (o G) es glicina.

15. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 7-14, donde el oligómero antisentido se encuentra en forma de base libre.

16. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 7-14, donde el oligómero antisentido es una sal farmacéuticamente aceptable de este.

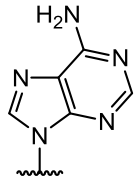
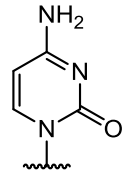
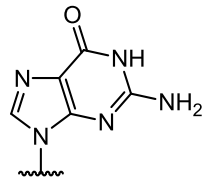
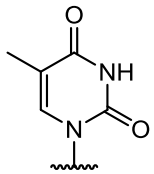
17. Un oligómero antisentido de acuerdo con la Fórmula (III):



(III)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5' a 3' corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5' a 3']**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde A es  , C es  , G es  y T es  , y el –OH distal de fórmula (III) está opcionalmente unido a un péptido que penetra en las células.

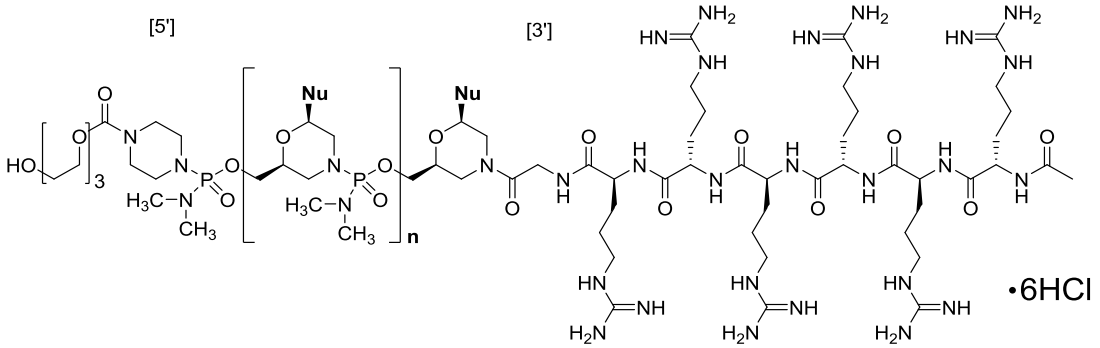
18. El oligómero antisentido de la reivindicación 17, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ de Fórmula (III) corresponde a la SEQ ID NO: 3.

19. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 17-18, donde el oligómero antisentido se encuentra en forma de base libre.

20. El oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 17-18, donde el oligómero antisentido es una sal farmacéuticamente aceptable de este.

21. El oligómero antisentido de la reivindicación 20, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a la SEQ ID NO: 3.

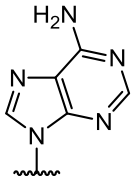
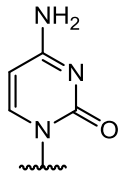
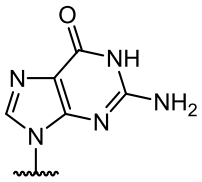
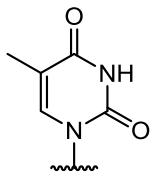
22. Un oligómero antisentido de acuerdo con la Fórmula (IV):



(IV)

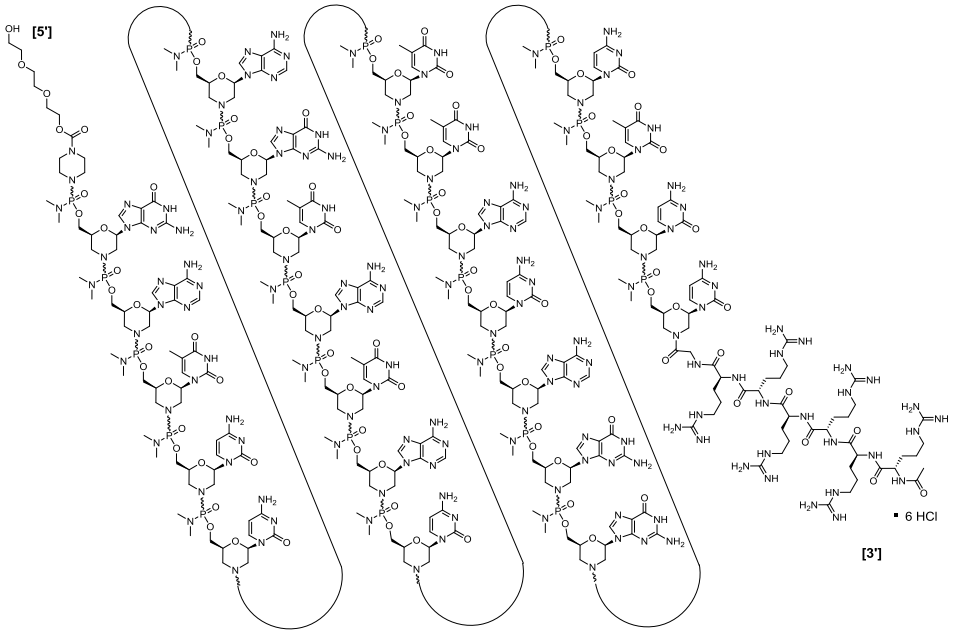
donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ corresponde a las nucleobases de una de las siguientes:

Sitio de hibridación	**Secuencia dirigida [5’ a 3’]**	**SEQ ID NO:**
H50D(+04-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG C	SEQ ID NO: 1
H50D(+07-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 2
H50D(+07-16)	GAT CCA GTA TAC TTA CAG GCT CC	SEQ ID NO: 3
H50D(+07-17)	GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 4
H50A(-19+07)	ACT TCC TCT TTA ACA GAA AAG CAT AC	SEQ ID NO: 5
H50D(+07-15)	ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC C	SEQ ID NO: 6
H50A(-02+23)	GAG CTC AGA TCT TCT AAC TTC CTC T	SEQ ID NO: 7
H50D(+06-18)	GGG ATC CAG TAT ACT TAC AGG CTC	SEQ ID NO: 8
H50D(+07-20)	ATG GGA TCC AGT ATA CTT ACA GGC TCC	SEQ ID NO: 9

donde A es  , C es  , G es  y T es  , y el –OH distal de fórmula (IV) está opcionalmente unido a un péptido que penetra en las células.

23. El oligómero antisentido de la reivindicación 22, donde cada **Nu** de 1 a **n** y de 5’ a 3’ de Fórmula (IV) corresponde a la SEQ ID NO: 3.

24. El oligómero antisentido de la reivindicación 22, donde el oligómero antisentido es acorde a la estructura de la Fórmula (IVa)



(IVa)

25. Una composición farmacéutica que comprende un oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

26. Un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz del oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, o la composición farmacéutica de la reivindicación 25.

27. El método de la reivindicación 26, donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50.

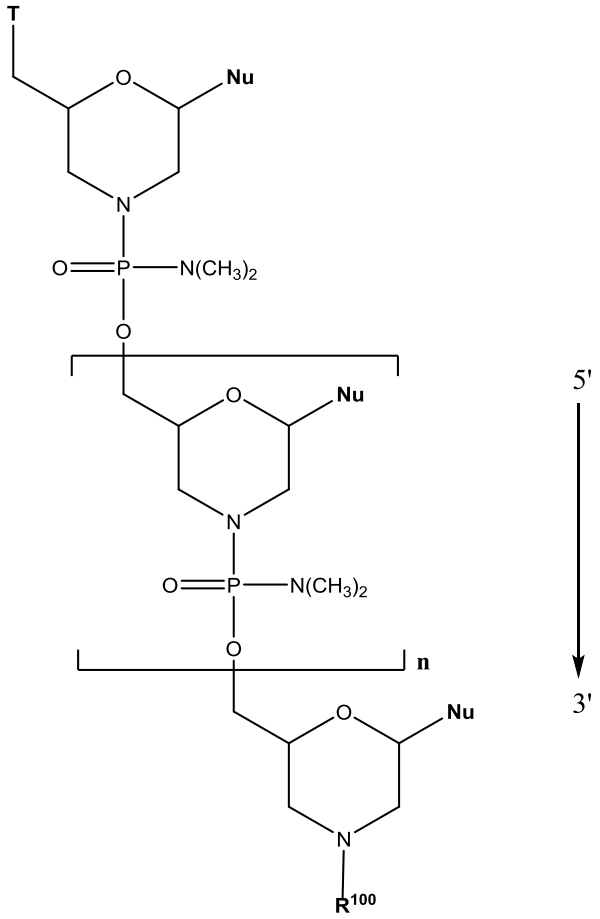
28. Un método para reestablecer un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de distrofina en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto

una cantidad terapéuticamente eficaz del oligómero antisentido de cualquiera de las reivindicaciones 1-24, o la composición farmacéutica de la reivindicación 25.

29. El método de la reivindicación 28, donde el sujeto tiene una mutación del gen de distrofina que es susceptible de salto del exón 50.

RESUMEN

Se describen oligómeros antisentido complementarios a un sitio diana seleccionado en el gen de distrofina humano para inducir salto del exón 50. En varios aspectos, se describen oligómeros antisentido de acuerdo con la Fórmula (I):



(I)

o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde **T**, **Nu**, **n** y **R^{100}** se definen en la presente.