

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 955 539**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2009 E 21155461 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2023 EP 3875587**

(54) Título: **Composiciones de omisión exónica múltiple para DMD**

(30) Prioridad:

24.10.2008 US 108416 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

04.12.2023

(73) Titular/es:

**SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
215 First Street
Cambridge, MA 02142, US**

(72) Inventor/es:

**SAZANI, PETER y
KOLE, RYSZARD**

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 955 539 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones de omisión exónica múltiple para DMD

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

La presente solicitud reivindica el beneficio en virtud de 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos Núm. 61/108,416 presentada el 24 de octubre de 2008.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos compuestos y composiciones antisentido adecuadas para facilitar la omisión de exones en el gen de la distrofina humana. Proporciona además las composiciones antisentido para usarse en el tratamiento de distrofia muscular.

15 **Antecedentes de la invención**

Se están desarrollando tecnologías antisentido utilizando una serie de procesos químicos para afectar a la expresión génica en una diversidad de niveles diferentes (transcripción, corte y empalme, estabilidad, traducción). Gran parte 20 de esa investigación se ha centrado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar genes anómalos o asociados a enfermedad en un amplio abanico de indicaciones. Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica de manera específica y por ello se han realizado numerosos esfuerzos relacionados con los oligonucleótidos como moduladores de la expresión génica centrados en inhibir la expresión de genes diana o el funcionamiento de los elementos de acción en cis. Los oligonucleótidos antisentido típicamente están dirigidos 25 contra el ARN, la cadena de sentido (p.ej., el ARNm) o la cadena negativa en el caso de algunos ARN diana víricos. Para conseguir un efecto deseado de regulación génica negativa específica, los oligonucleótidos generalmente estimulan la degradación del ARNm diana, bloquean la traducción del ARNm o bloquean la función de los elementos de ARN de acción en cis, impidiendo eficazmente de esta manera la síntesis *de novo* de la proteína diana o la replicación del ARN vírico.

30 Sin embargo, dichas técnicas no resultan útiles en los casos en que el objetivo es regular positivamente la producción de la proteína nativa o compensar mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tales como mutaciones sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura. En estos casos, el transcripto defectuoso del gen no debería someterse a degradación dirigida o inhibición estérica, por lo que el proceso químico 35 del oligonucleótido antisentido no debería estimular la degradación del ARNm diana o bloquear la traducción.

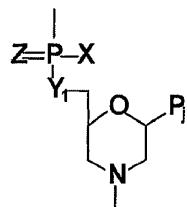
En una diversidad de enfermedades genéticas, los efectos de las mutaciones sobre la expresión final de un gen 40 pueden modularse a través de un procedimiento dirigido de omisión exónica durante el proceso de corte y empalme. El proceso de corte y empalme está dirigido por una compleja maquinaria multicomponente que reúne en estrecha proximidad las uniones exón-intrón contiguas en el pre-ARNm y realiza el corte de los enlaces fosfodiéster en los 45 extremos de los intrones con su posterior reforma entre los exones que van a cortarse y empalmarse entre sí. Este proceso complejo y de elevada precisión está mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm que son segmentos de ARN relativamente cortos y semiconservados a los que se unen los diversos factores nucleares de corte y empalme que participan después en las reacciones de corte y empalme. Mediante la modificación de la forma 50 en que la maquinaria de corte y empalme lee o reconoce los motivos que participan en el procesamiento del pre-ARNm, resulta posible crear moléculas de ARNm cortadas y empalmadas de forma diferencial. Actualmente se ha reconocido que la mayoría de los genes humanos se cortan y empalman de forma alternativa durante la expresión génica normal, aunque no se han identificado los mecanismos implicados.

55 En los casos en que una proteína normalmente funcional es terminada prematuramente debido a mutaciones en la misma, se ha demostrado que resulta posible un medio para restaurar cierta cantidad de producción de proteína funcional mediante tecnología antisentido, mediante la intervención durante los procesos de corte y empalme, y que, si pueden delecionarse específicamente exones asociados a mutaciones causantes de enfermedad de algunos genes, en ocasiones puede producirse un producto proteico acortado que presenta propiedades biológicas similares a las de la proteína nativa o que presenta suficiente actividad biológica para mejorar la enfermedad causada por 60 mutaciones asociadas al exón (Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Artsma-Rus, Janson et al. 2004). Kole et al. (patentes US nº 5.627.274, nº 5.916.808, nº 5.976.879 y nº 5.665.593) dan a conocer métodos para combatir el corte y empalme aberrantes utilizando análogos de oligonucleótido antisentido modificado que no estimulan la degradación del pre-ARNm diana. Bennett et al.(patente US nº 6.210.892) describen la modulación antisentido del procesamiento del ARNm celular de tipo salvaje que también utiliza análogos de oligonucleótido antisentido que no inducen el corte mediado por ARNasa H del ARN diana.

65 El procedimiento de omisión exónica dirigida probablemente resultará particularmente útil en genes largos, donde hay muchos exones e intrones, donde existe redundancia en la constitución genética de los exones o donde una proteína es capaz de funcionar sin uno o más exones particulares. Los esfuerzos por redirigir el procesamiento

- génico al tratamiento de enfermedades genéticas asociadas a truncados causados por mutaciones en diversos genes se han centrado en la utilización de oligonucleótidos antisentido que: (1) se solapan total o parcialmente con los elementos que participan en el proceso de corte y empalme, o (2) se unen al pre-ARNm en una posición suficientemente próxima al elemento para alterar la unión y funcionamiento de los factores de corte y empalme que normalmente mediarían en una reacción particular de corte y empalme que se produce en ese elemento.
- 5 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) está causada por un defecto en la expresión de la proteína distrofina. El gen codificante de la proteína contiene 79 exones extendidos a lo largo de más de 2 millones de nucleótidos de ADN. Cualquier mutación exónica que modifique el marco de lectura del exón o introduzca un codón de parada o se 10 caracterice por la eliminación de un exón o exones completamente fuera de marco o duplicaciones de uno o más exones, presenta el potencial de alterar la producción de la distrofina funcional, resultando en DMD.
- 15 Una forma menos grave de distrofia muscular, la distrofia muscular de Becker (DMB) se ha encontrado que aparece donde una mutación, típicamente una delección de uno o más exones, resulta en un marco de lectura correcto a lo largo del transcripto entero de la distrofina de manera que la traducción del ARNm en proteína no se termina prematuramente. En el caso de que la unión de los exones cadena arriba y cadena abajo en el procesamiento de un 20 pre-ARNm de distrofina mutado mantenga el marco de lectura correcto del gen, el resultado será un ARNm codificante de una proteína con una delección interna corta que conserva algo de actividad, resultando en un fenotipo de Becker.
- 25 Las delecciones de un exón o exones que no alteran el marco de lectura de una proteína distrofina dan lugar a un fenotipo DMB, mientras que una delección de exón que causa un desplazamiento de marco dará lugar a DMD (Monaco, Bertelson et al., 1988). En general, las mutaciones de la distrofina, incluyendo las mutaciones puntuales y las delecciones de exones que cambian el marco de lectura y, de esta manera, interrumpen una traducción correcta 30 de la proteína resultan en DMD. Debe indicarse que algunos pacientes de DMB y DMD presentan delecciones exónicas que cubren múltiples exones.
- 35 Aunque las moléculas antisentido pueden proporcionar una herramienta en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD), los intentos de inducir la omisión exónica utilizando moléculas antisentido no siempre han tenido éxito. La omisión con éxito del exón 19 de la distrofina en el pre-ARNm de la distrofina se ha conseguido utilizando 35 una diversidad de moléculas antisentido dirigidas a los sitios o motivos de corte y empalme flanqueantes dentro del exón implicado en la definición del exón, tal como describen Errington et al. (Errington, Mann et al., 2003).
- 40 El primer ejemplo de omisión exónica específica y reproducible en el modelo de ratón *mdx* fue informado por Wilton et al. (Wilton, Lloyd et al., 1999). Mediante la dirección de una molécula antisentido al sitio de corte y empalme donante, se indujo la omisión del exón 23 en el ARNm de la distrofina a las 6 horas de tratamiento de las células cultivadas. Wilton et al. también describen el uso como diana de la región aceptora del pre-ARNm de la distrofina de ratón con oligonucleótidos antisentido más largos. Aunque el primer oligonucleótido antisentido dirigido al sitio de corte y empalme donante del intrón 23 inducía la omisión de exones en mioblastos en cultivo primario, se encontró 45 que este compuesto era mucho menos eficiente en cultivos de células inmortalizadas que expresaban niveles más elevados de distrofina.
- A pesar de estos esfuerzos, sigue existiendo una necesidad de oligómeros antisentido mejorados con diana en 45 múltiples exones de la distrofina y composiciones y métodos de administración muscular mejorados para aplicaciones terapéuticas de la DMD.
- Breve descripción de la invención**
- 50 Realizaciones de la presente invención se refieren de manera general a compuestos antisentido como se refine en las reivindicaciones capaces de unirse a una diana seleccionada para inducir la omisión de exón 5, y los compuestos antisentido que inducen la omisión de exón 5 para usarse en el tratamiento de distrofia muscular. En ciertas realizaciones, es posible combinar dos o más oligonucleótidos antisentido de la presente invención de forma conjunta para inducir la omisión individual o múltiple del exón 50.
- 55 En determinadas realizaciones, resulta posible mejorar la omisión exónica de uno o múltiples exones mediante la unión covalente de dos o más moléculas de oligonucleótido antisentido (ver, p.ej., Aartsma-Rus, Janson et al., 2004). Los compuestos antisentido de la presente invención inducen la omisión del exón 50 en el gen de la distrofina humana y permiten de esta manera que las células musculares produzcan una proteína distrofina funcional.
- 60 Los compuestos oligonucleótidos antisentido (también denominados en la presente memoria oligómeros) de la presente invención: (i) comprenden subunidades morfolino y enlaces intersubunidad que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de una subunidad contigua, (ii) contienen 65 20 a 35 subunidades de morfolino, (iii) comprenden una secuencia de bases de SEQ. ID. NO. 287 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a la misma, y son complementarias al pre-mARN de distrofina para inducir la omisión del exón 50.

En determinadas realizaciones, los compuestos antisentido de la presente invención pueden comprender enlaces intersubunidad que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de una subunidad contigua, de acuerdo con la estructura (I) a continuación:



(I)

5

en la que:

Y₁ es -O-, -S-, -NH- o -CH₂-,

Z es O o S,

Pj es una fracción de apareamiento con base purina o pirimidina eficaz para la unión, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base en un polinucleótido, y

X es flúor, opcionalmente alquilo sustituido, alcoxi sustituido opcionalmente, tioalcoxi sustituido opcionalmente, amino, alquilamino sustituido opcionalmente o heterociclico sustituido opcionalmente.

15

En determinadas realizaciones, los enlaces intersubunidad anteriormente indicados, que no presentan carga, pueden intercalarse con enlaces con carga positiva a pH fisiológico, en donde el número total de enlaces con carga positiva es de entre 2 y no más de la mitad del número total de enlaces. Por ejemplo, los enlaces con carga positiva pueden presentar la estructura anteriormente indicada, en la que X es 1-piperazinilo sustituido opcionalmente. En otras realizaciones, los enlaces con carga positivo pueden presentar la estructura anteriormente indicada, en la que X es 1-piperazinilo sustituido, en el que el 1-piperazinilo se sustituye en la posición 4 con una fracción alquilguanidinilo sustituida opcionalmente.

25

En determinadas realizaciones, la secuencia antisentido de la presente invención está contenida en: SEC ID nº 277, 287 y 290, y más preferentemente la SEC ID nº 287 para la utilización en la producción de la omisión del exón 50 en el procesamiento del ARNm preprocesado de la distrofina humana,

30

En determinadas realizaciones, el compuesto puede conjugarse con un polipéptido rico en arginina eficaz para estimular la incorporación del compuesto en las células. Entre los péptidos ejemplares se incluyen los identificados por las SEC ID nº 570 a 578, entre otros indicados en la presente memoria.

35

En una realización ejemplar, el polipéptido rico en argininas se acopla covalentemente en su residuo de extremo N-terminal o C-terminal con el extremo 3' o 5' del compuesto antisentido. También en una realización ejemplar, el compuesto antisentido está compuesto de subunidades morfolino y enlaces intersubunidad que contienen fósforo que enlazan un nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente.

40

En general, el conjugado de péptido-oligómero puede comprender además un péptido de localización que es selectivo para un tejido de mamífero seleccionado, es decir, el mismo tejido que es la diana del péptido de penetración celular. El conjugado puede presentar la forma de: péptido de penetración celular - péptido de localización - oligómero antisentido, o más preferentemente, la forma de: péptido de localización - péptido de penetración celular - oligómero antisentido. Por ejemplo, un compuesto conjugado de péptido para la utilización en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, tal como se ha descrito anteriormente, puede comprender además un péptido de localización que sea selectivo para el tejido muscular, tal como el péptido con la secuencia identificada como SEC ID nº 579, conjugado con el péptido de penetración celular. Entre los conjugados ejemplares de este tipo se incluyen los representados en la presente memoria como CP06062-MSP-PMO (péptido de penetración celular - péptido de localización - oligómero antisentido) y como MSP-CP06062-PMO (péptido de localización - péptido de penetración celular - oligómero antisentido) (ver las SEC ID nº 580 a 583).

45

En algunas realizaciones, el péptido se conjugado con el oligómero mediante una fracción conectora. En determinadas realizaciones, la fracción conectora puede comprender una fracción piperazinilo sustituida opcionalmente. En otras realizaciones, la fracción conectora puede comprender además una subunidad beta-alanina y/o ácido 6-aminohexanoico. En todavía otras realizaciones, el péptido se conjuga directamente con el oligómero sin una fracción conectora.

55

La conjugación del péptido con el oligómero puede encontrarse en cualquier posición adecuada para formar un enlace covalente entre el péptido y el oligómero o entre la fracción conectora y el oligómero. Por ejemplo, en algunas realizaciones la conjugación del péptido puede realizarse en el extremo 3' del oligómero. En otras realizaciones, la

conjugación del péptido con el oligómero puede realizarse en el extremo 5' del oligómero. En todavía otras realizaciones, el péptido puede conjugarse con el oligómero mediante cualquiera de los enlaces intersubunidad.

5 En algunas realizaciones, el péptido se conjuga con el oligómero en el extremo 5' del oligómero. En realizaciones que comprenden enlaces intersubunidad que contienen fósforo , el péptido puede conjugarse con el oligómero mediante un enlace covalente con el fósforo del grupo de enlace terminal. La conjugación de esta manera puede producirse con o sin la fracción conectora indicada anteriormente.

10 En todavía otras realizaciones, el péptido puede conjugarse con el oligómero en el extremo 3' del oligómero. En algunas realizaciones adicionales, el péptido puede conjugarse con el átomo de nitrógeno del grupo morfolino 3'- terminal del oligómero. A este respecto, el péptido puede conjugarse con el oligómero directamente o mediante la fracción conectora indicada anteriormente.

15 En algunas realizaciones, el oligómero puede conjugarse con una fracción que potencia la solubilidad del oligómero en medio acuoso. En algunas realizaciones, la fracción que potencia la solubilidad del oligómero en medio acuoso es un polietilenglicol. En realizaciones todavía adicionales, la fracción que potencia la solubilidad del oligómero en medio acuoso es trietilenglicol. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la fracción que potencia la solubilidad en medio acuoso puede conjugarse con el oligómero en el extremo 5' del oligómero. La conjugación de la fracción que potencia la solubilidad del oligómero en medio acuoso con el oligómero puede realizarse directamente o mediante la fracción conectora indicada anteriormente.

20 Determinadas realizaciones de la presente invención proporcionan moléculas antisentido seleccionadas y/o adaptadas para ayudar en el tratamiento profiláctico o terapéutico de un trastorno genético que comprende por lo menos una molécula antisentido en una forma adecuada para la administración en el paciente.

25 La presente invención también incluye los oligonucleótidos antisentido purificados y aislados de la invención, para usarse en el tratamiento de una enfermedad genética.

30 Determinadas realizaciones de la invención proporcionan oligonucleótidos antisentido y composiciones farmacéuticas para la utilización en el tratamiento de la distrofia muscular, tal como una condición caracterizada como distrofia muscular de Duchenne. Adicionalmente determinadas realizaciones proporcionan un oligonucleótido antisentido como se define en la presente, para usarse para tratar profilácticamente un paciente para prevenir o por lo menos minimizar la distrofia muscular, incluyendo la distrofia muscular de Duchenne.

35 Determinadas realizaciones se refieren a un compuesto antisentido sustancialmente no cargado que contiene 20 a 35 subunidades morfolino unidas mediante enlaces intersubunidad que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de una subunidad contigua, que comprende una secuencia de bases de SEC ID nº 287 y capaz de formar con la secuencia de ARNm complementaria en un exón de gen de distrofina una estructura heterodúplex entre dicho compuesto y el ARNm con una Tm de por lo menos 45°C, en el que el exón es el exón 50 para usarse en el tratamiento de la distrofia muscular

40 En determinadas realizaciones, la distrofia muscular es la distrofia muscular de Duchenne (DMD). En determinadas realizaciones, la distrofia muscular es la distrofia muscular de Becker (DMB).

45 En determinadas realizaciones, la secuencia es SEC ID nº 287, y el exón es el exón 50. En determinadas realizaciones, la secuencia comprende o consiste esencialmente de SEC ID nº 287

50 Determinadas realizaciones proporcionan kits para el tratamiento de una enfermedad genética, kits que comprenden por lo menos un oligonucleótido de la presente invención, envasados en un recipiente adecuado e instrucciones para su utilización.

55 Estos y otros objetivos y características se entenderán más completamente tras la lectura de la descripción detallada de la invención siguiente junto con las figuras.

Breve descripción de las figuras

60 La figura 1A muestra una estructura de oligómero morfolino ejemplar con un enlace fosforodiamidato.
La figura 1B muestra un conjugado de un péptido rico en argininas y un oligómero antisentido, de acuerdo con una realización de la invención.
La figura 1C muestra un conjugado tal como en la figura 1B, en el que los enlaces del esqueleto contienen uno o más grupos cargados positivamente.
Las figuras 1D-G muestran el segmento de subunidades repetidas de los oligonucleótidos morfolino ejemplares, denominados D a G.
65 La figura 2A (no parte de la invención) muestra la localización relativa y resultados de un escaneo de exón 51 de un oligómero antisentido diseñado para inducir la omisión del exón 51 de la distrofina humana.

- Las figuras 2B-C (no parte de la invención) muestran la actividad relativa en células de rhabdomiosarcoma (RD) humano en cultivo y células de músculo esquelético primarias humanas de los tres mejores oligómeros seleccionados del escaneo del exón 51 (SEC ID nº 324, 326 y 327) respecto a las secuencias (AVI-5658, SEC ID nº 588 y h51AON1, SEC ID nº 594) que resultan eficaces en la inducción de la omisión del exón 51. La figura 2D muestra la localización relativa dentro del exón 51 de tres oligómeros seleccionados en comparación con determinadas secuencias.
- La figura 3A muestra la localización relativa y los resultados de un escaneo del exón 50 de oligómero antisentido diseñado para inducir la omisión del exón 50 de la distrofina humana en comparación con otras secuencias que inducen la omisión del exón 50.
- La figura 3B muestra la localización y actividad relativas de las secuencias antisentido seleccionadas del escaneo del exón 50 (SEC ID nº 277, 287, 290 y 291) en comparación con otras secuencias (SEC ID nº 584 y 585).
- La figura 4A (no parte de la invención) muestra la localización relativa y resultados de un escaneo de exón 53 de un oligómero antisentido diseñado para inducir la omisión del exón 53 de la distrofina humana. La figura 4B muestra la localización relativa de determinadas secuencias utilizadas para comparar la actividad de omisión exónica de aquellos oligómeros seleccionados como más activos en el escaneo del exón 53.
- Las figuras 4C-F (no parte de la invención) muestran los resultados de los estudios de determinación de dosis, resumidos en la figura 4B, utilizando los oligómeros seleccionados como más eficaces en el escaneo del exón 53 (SEC ID nº 422, 428, 429 y 431).
- Las figuras 4H y 4I (no parte de la invención) muestran la actividad relativa de determinadas secuencias (SEC ID nº 608 a 611) en comparación con la actividad del oligómero de omisión del exón 53 más activo (SEC ID nº 429) tanto en células RD como en células de músculo esquelético primarias humanas.
- La figura 5A (no parte de la invención) muestra la localización relativa y resultados de un escaneo de exón 44 de un oligómero antisentido diseñado para inducir la omisión del exón 44 de la distrofina humana. La figura 5B muestra la localización relativa dentro del exón 44 de determinadas secuencias utilizadas para comparar la actividad de omisión exónica de aquellos oligómeros seleccionados como más activos en el escaneo del exón 44.
- Las figuras 5C-G (no parte de la invención) muestran los resultados de los estudios de determinación de dosis, resumidos en la figura 5H, utilizando los oligómeros seleccionados como más eficaces en el escaneo del exón 44 (SEC ID nº 4, 8, 11, 12 y 13).
- Las figuras 5I y 5J (no parte de la invención) muestran la actividad relativa de determinadas secuencias (SEC ID nº 600 a 603) en comparación con la actividad del oligómero de omisión del exón 53 más activo (SEC ID nº 12) tanto en células RD como en células de músculo esquelético primarias humanas.
- La figura 6A (no parte de la invención) muestra la localización relativa y resultados de un escaneo de exón 45 de un oligómero antisentido diseñado para inducir la omisión del exón 45 de la distrofina humana. La figura 6B muestra la localización relativa dentro del exón 45 de determinadas secuencias utilizadas para comparar la actividad de omisión exónica de aquellos oligómeros seleccionados como más activos en el escaneo del exón 45.
- Las figuras 6C-F (no parte de la invención) muestran los resultados de los estudios de determinación de dosis, resumidos en la figura 6H, utilizando los oligómeros seleccionados como más eficaces en el escaneo del exón 45 (SEC ID nº 27, 29, 34 y 39). La figura 6G utiliza un oligómero relativamente inactivo (SEC ID nº 49) como control negativo.
- Las figuras 6I y 6J (no parte de la invención) muestran la actividad relativa de determinadas secuencias (SEC ID nº 604 a 607) en comparación con la actividad del oligómero de omisión del exón 53 más activo (SEC ID nº 34) tanto en células RD como en células de músculo esquelético primarias humanas.

45 Descripción detallada de la invención

- Las realizaciones de la presente invención se refieren de manera general a compuestos antisentido mejorados y a métodos de uso de los mismos, que están diseñados específicamente para inducir la omisión exónica en el gen de la distrofina. La distrofina desempeña un papel vital en la función muscular y diversas enfermedades de tipo muscular se caracterizan por formas mutadas de este gen. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, los compuestos antisentido mejorados descritos en la presente memoria inducen omisión exónica en formas mutadas del gen de la distrofina humana, tal como los genes de distrofina mutados que se encuentran en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y en la distrofia muscular de Becker (DMB).
- 55 Debido a sucesos de corte y empalme aberrantes del ARNm causados por mutaciones, estos genes mutados de la distrofina humana expresan una proteína distrofina defectiva o no expresan en absoluto distrofina medible, una condición que conduce a diversas formas de distrofia muscular. Para remediar esta condición, los compuestos antisentido de la presente invención típicamente se hibridan con regiones seleccionadas de n ARN preprocesado de un gen mutado de la distrofina humana, inducen la omisión exónica y el corte y empalme diferencial en ARNm de distrofina que de otro modo se cortaría y empalmaría aberrantemente, y de esta manera permiten que las células musculares produzcan un transcripto de ARNm que codifica una proteína distrofina funcional. En determinadas realizaciones, la proteína distrofina resultante no es necesariamente la forma de "tipo salvaje" de la distrofina sino que es una forma de la distrofina truncada, aunque funcional o semifuncional.
- 65 Mediante el incremento de los niveles de proteína distrofina funcional en las células musculares, éstas y realizaciones relacionadas pueden resultar útiles en la profilaxis y tratamiento de la distrofia muscular, especialmente

5 aquellas formas de distrofia muscular, tales como la DMD y la DMB, que se caracterizan por la expresión de proteínas de distrofina defectuosas debido al corte y empalme aberrante del ARNm. Los oligómeros específicos indicados en la presente memoria proporcionan además un reconocimiento específico de exón de la distrofina mejorado y, de esta manera, ofrecen ventajas significativas y prácticas respecto a métodos alternativos de tratamiento de formas relevantes de distrofia muscular.

10 A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria presentan los mismos significados entendidos comúnmente por el experto ordinario en la materia a la que se refiere la invención. Aunque también pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la 15 presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales preferentes. Para los fines de la presente invención se definen a continuación los términos siguientes.

Definiciones

15 Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A título de ejemplo, "un elemento" se refiere a un elemento o a más de un elemento.

20 El término "aproximadamente" se refiere a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía en hasta 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, anchura o longitud de referencia.

25 La expresión "secuencia codificante" se refiere a cualquier secuencia de ácidos nucleicos que contribuye al código del producto polipéptido de un gen. En contraste, la expresión "secuencia no codificante" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuye al código del producto polipéptido de un gen.

30 En la totalidad de la presente memoria, a menos que el contexto indique lo contrario, los términos "comprende" y "comprendiendo" se entenderá que implican la inclusión de una etapa, elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de cualquier otra etapa, elemento o grupo de etapas o elementos.

35 La expresión "que consiste en" pretende incluir, y se encuentra limitada a, lo que siga a la expresión "que consiste en". De esta manera, la expresión "que consiste en" indica que los elementos listados resultan necesarios u obligatorios y que no puede encontrarse presente ningún otro elemento. La expresión "que consiste esencialmente en" pretende incluir cualesquiera elementos listados después de la expresión y limitada a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la exposición de los elementos listados. De esta 40 manera, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos listados resultan necesarios u obligatorios pero que otros elementos son opcionales y pueden encontrarse presentes o no dependiendo de si afectan o no a la actividad o acción de los elementos listados.

45 Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T-" es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de ácidos nucleicos se aparean de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O puede existir una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las 50 cadenas de ácidos nucleicos presenta efectos significativos sobre la eficiencia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácidos nucleicos. Aunque con frecuencia se desea la complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir una o más, aunque preferentemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 no correspondencia con respecto al ARN diana. Se encuentran incluidas variaciones en cualquier localización dentro del oligómero. En determinadas realizaciones, las variaciones de secuencia próximas a los extremos de un oligómero generalmente resultan preferibles a las variaciones en el interior, y si se encuentran presentes, típicamente se encuentran aproximadamente a 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótido del extremo 5' y/o 3'.

55 Las expresiones "péptido de penetración celular" o "PPC" se utilizan intercambiablemente y se refieren a péptidos de penetración celular catiónicos, también denominados péptidos de transporte, péptidos portadores o dominios de transducción de péptidos. Los péptidos, tal como se muestra en la presente memoria, presentan la capacidad de inducir la penetración celular en 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de las células de una población de cultivo celular dada, incluyendo todos los números enteros entre dichos porcentajes, y permiten la traslocación macromolecular dentro de múltiples tejidos *in vivo* con la administración sistémica.

60 Las expresiones "oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" se utilizan intercambiablemente y se refieren a una secuencia de subunidades cílicas, cada una portadora de una fracción de apareamiento de bases, unida mediante enlaces intersubunidad que permiten que las fracciones de apareamiento de bases se hibriden con una secuencia diana en un ácido nucleico (típicamente un ARN) mediante apareamiento de bases de Watson-Crick, formando un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia diana. Las subunidades cílicas se basan en ribosa o en otro azúcar pentosa o, en una realización preferente, en un grupo morfolino (ver la descripción 65 de los oligómeros morfolino, posteriormente).

Dicho oligómero antisentido puede diseñarse para bloquear o inhibir la traducción del ARNm o para inhibir el procesamiento natural mediante corte y empalme del pre-ARNm y puede afirmarse que se encuentra "dirigido a" o "presenta como diana" una secuencia diana con la que se hibrida. En determinadas realizaciones, la secuencia diana incluye una región que incluye un codón de inicio AUG de un ARNm, un sitio de corte y empalme 3' o 5' de un ARNm preprocesado, o un punto de ramificación. La secuencia diana puede encontrarse dentro de un exón o dentro de un intrón. La secuencia diana para un sitio de corte y empalme puede incluir una secuencia de ARNm con su extremo 5' situado 1 a aproximadamente 25 pares de bases cadena abajo de una unión normal aceptora de empalme en un ARNm preprocesado. Una secuencia diana preferente para un corte y empalme es cualquier región de un ARNm preprocesado que incluye un sitio de corte y empalme o que se encuentre contenida completamente dentro de una secuencia codificante de exón o que incluya un sitio acceptor o donante de corte y empalme. Un oligómero se afirma más generalmente que "está dirigido contra" una diana biológicamente relevante, tal como una proteína, virus o bacteria, en el caso que esté dirigido contra el ácido nucleico de la diana de la manera indicada anteriormente. Se incluyen oligómeros antisentido que comprenden, consisten esencialmente en, o consisten en, SEC ID nº 287. También se incluyen variantes de estos oligómeros antisentido incluidos oligómeros variantes con una identidad de secuencias u homología de secuencias de 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% o 99% (incluidos todos los números enteros comprendidos entre estos porcentajes) respecto a SEC ID nº 287 y/o variantes que difieren de dichas secuencias en aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos, preferentemente aquellas variantes que inducen la omisión exónica de uno o más exones de distrofina humana.

La expresión "oligómero morfolino" o "PMO" (oligómero morfolino fosforamidato o fosforodiamidato) se refiere a un análogo de oligonucleótido compuesto de estructuras de subunidad morfolino en las que: (i) las estructuras están unidas entre sí mediante enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferentemente de dos átomos de longitud, y preferentemente sin carga o catiónicos, que unen el nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de una subunidad contigua, e (ii) cada anillo morfolino porta una fracción de apareamiento con base purina o pirimidina eficaz para unirse, mediante enlaces de hidrógeno específicos de base, a una base en un polinucleótido. Pueden realizarse variaciones en este enlace con la condición de que no interfieran con la unión o actividad. Por ejemplo, el oxígeno unido al fósforo puede sustituirse por azufre (trifosforodiamidato). El oxígeno 5' puede sustituirse por amino o amino con sustitución de alquilo inferior. El nitrógeno colgante unido al fósforo puede estar no sustituido, monosustituido o disustituido con alquilo inferior (sustituido opcionalmente). Ver también la discusión sobre enlaces catiónicos, posteriormente. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros morfolino se detallan en las patentes US nº 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063, y 5.506.337, y solicitud de patente PCT nº PCT/US07/11435 (enlaces catiónicos).

La fracción de apareamiento de base purina o pirimidina típicamente es adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. Se incluyen además bases tales como piridín-4-ona, piridín-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxi benceno, 3-metil-uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidinas (p.ej., 5-metilcitidina), 5-alquiluridinas (p.ej., ribotimidina), 5-halouridina (p.ej., 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (p.ej., 6-metiluridina), propino, quesoquina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wibutosina, wibutoxosina, 4-acetiltilidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, β-D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarboniletiluridina, 5-metiloxyuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, β-D-manosilqueosina, ácido uridín-5-oxiacético, 2-tiocitidina, derivados de treonina y otros (Burgin et al., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman y Peyman, supra). La expresión "bases modificadas" en dicho aspecto se refiere a bases nucleótidas diferentes de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), tal como se ha ilustrado anteriormente; tales bases pueden utilizarse en cualquier posición en la molécula antisentido. El experto en la materia apreciará que, dependiendo de los usos de los oligómeros, las T y U son intercambiables. Por ejemplo, con otras reacciones químicas antisentido, tales como los oligonucleótidos antisentido 2'-O-metilo que son de tipo ARN, las bases T pueden mostrarse como U (ver, p.ej., la lista de ID de secuencia).

Una "subunidad aminoácido" o "residuo aminoácido" puede referirse a un residuo α-aminoácido (p.ej., -CO-CHR-NH-) o un residuo β-aminoácido u otro residuo aminoácido (p.ej., -CO-(CH₂)_nCHR-NH-), donde R es una cadena lateral (que puede incluir hidrógeno) y n es 1 a 6, preferentemente 1 a 4.

La expresión "aminoácido natural" se refiere a un aminoácido presente en proteínas presentes en la naturaleza, tales como los 20 (L)-aminoácidos utilizados durante la biosíntesis de proteínas, así como otros, tales como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina. La expresión "aminoácidos no naturales" se refiere a aquellos aminoácidos no presentes en proteínas presentes en la naturaleza, entre los ejemplos de los cuales se incluyen beta-alanina (β-Ala; o B), ácido 6-aminohexanoico (Ahx) y ácido 6-aminopentanoico. Entre los ejemplos adicionales de "aminoácidos no naturales" se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, que son conocidos por el experto en la materia.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de compuesto terapéutico, tal

como un oligómero antisentido, administrado en un sujeto mamífero, como dosis individual o como parte de una serie de dosis, que resulta eficaz para producir una respuesta fisiológica o efecto terapéutico en el sujeto. Un ejemplo de una respuesta fisiológica deseada incluye la expresión incrementada de una forma relativamente funcional o biológicamente activa de la proteína distrofina, principalmente en tejidos o celulares musculares que contienen una proteína distrofina defectuosa o no contienen distrofina, en comparación con oligómero antisentido o un oligómero de control. Entre los ejemplos de efectos terapéuticos deseados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, mejoras de los síntomas o patología de la distrofia muscular, reduciendo la progresión de los síntomas o la patología de la distrofia muscular, y el retraso de la aparición de los síntomas o la patología de la distrofia muscular, entre otros. Entre los ejemplos de tales síntomas se incluyen fatiga, retardo mental, debilidad muscular, dificultad con las habilidades motoras (p.ej., correr, brincar, saltar), caídas frecuentes y dificultades en la deambulación. La patología de la distrofia muscular puede caracterizarse, por ejemplo, por daños en las fibras musculares y fugas membranales. Para un oligómero antisentido, este efecto típicamente se produce mediante la alteración del procesamiento por corte y empalme de una secuencia diana seleccionada (p.ej., distrofina), tal como para inducir la omisión exónica.

Un “exón” se refiere a una sección definida de ácido nucleico que codifica para una proteína, o una secuencia de ácido nucleico que está representada en la forma madura de una molécula de ARN después de que partes de un ARN preprocesado (o precursor) hayan sido eliminadas mediante corte y empalme. La molécula de ARN maduro puede ser un ARN mensajero (ARNm) o una forma funcional de un ARN no codificante, tal como ARNr o ARNt. El gen de distrofina humano presenta aproximadamente 75 exones.

Un “intrón” se refiere a una región de ácido nucleico (dentro de un gen) que no resulta traducida en una proteína. Un intrón es una sección no codificante que se transcribe en un ARNm precursor (pre-ARNm) y posteriormente se elimina mediante corte y empalme durante la formación del ARN maduro.

La expresión “omisión exónica” se refiere de manera general al procedimiento por el que un exón entero, o una parte del mismo, se elimina de un ARN preprocesado dado y de esta manera se excluye su presencia en el ARN maduro, tal como el ARNm maduro, que se traduce en una proteína. Por lo tanto, la parte de la proteína que de otro modo está codificada en el exón omitido no se encuentra presente en la forma expresada de la proteína, creando típicamente una forma alterada, aunque todavía funcional, de la proteína. En determinadas realizaciones, el exón que se omite es un exón aberrante del gen de la distrofina humana, que puede contener una mutación u otra alteración en su secuencia que de otro modo provoca un corte y empalme aberrante. El exón que se omite es el exón 50 del gen de distrofina.

La “distrofina” es una proteína citoplasmática en forma de barra, y una parte vital del complejo de proteína que conecta el citoesqueleto de una fibra muscular con la matriz extracelular circundante a través de la membrana celular. La distrofina contiene múltiples dominios funcionales. Por ejemplo, la distrofina contiene un dominio de unión a actina en aproximadamente los aminoácidos 14 a 240 y un dominio de barra central en aproximadamente los aminoácidos 253 a 3.040. Este dominio central grande está formado de 24 elementos de triple hélice de tipo espectrina de aproximadamente 109 aminoácidos, que presentan homología respecto a la alfa-actinina y la espectrina. Las repeticiones están típicamente interrumpidas por cuatro segmentos no repetidos ricos en prolina, también denominados regiones bisagra. Las repeticiones 15 y 16 están separadas por un tramo de 18 aminoácidos que aparentemente proporciona un sitio importante para el corte proteolítico de la distrofina. La identidad de secuencias entre la mayoría de repeticiones es de 10% a 25%. Una repetición contiene tres hélices alfa: 1, 2 y 3. Las hélices alfa 1 y 3 están formadas, cada una, por 7 giros helicoidales, probablemente interactuantes como hélice superenrollada mediante una interfaz hidrofóbica. La hélice alfa 2 presenta una estructura más compleja y está formada por segmentos de cuatro y tres giros helicoidales, separados por un residuo de glicina o prolina. Cada repetición está codificada por dos exones, típicamente interrumpidos por un intrón entre los aminoácidos 47 y 48 en la primera parte de la hélice alfa 2. El otro intrón se encuentra en posiciones diferentes en la repetición, habitualmente disperso por la hélice 3. La distrofina contiene además un dominio rico en cisteínas en aproximadamente los aminoácidos 3.080 a 3.360, incluyendo un segmento rico en cisteínas (es decir, 15 cisteínas en 280 aminoácidos), que muestran homología respecto al dominio C-terminal de la alfa-actinina del moho mucilaginoso (*Dictyostelium discoideum*). El dominio carboxi-terminal se encuentra en aproximadamente los aminoácidos 3.361 a 3.685.

El extremo amino-terminal de la distrofina se une a la F-actina y el extremo carboxi-terminal se une al complejo de proteína asociada a distrofina (DAPC, por sus siglas en inglés) en el sarcolema. El DAPC incluye distroglicanos, sarcoglicanos, integrinas y caveolina, y las mutaciones en cualquiera de estos componentes provoca distrofias musculares heredadas autosómicas. El DAPC es desestabilizado en caso de que se encuentre ausente la distrofina, resultando en niveles reducidos de las proteínas miembro y, a su vez, conduce a un daño progresivo en las fibras y fuga membranal. En diversas formas de distrofia muscular, tales como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB), las células musculares producen una forma alterada y funcionalmente defectuosa de la distrofina o nada de distrofina en absoluto, principalmente debido a mutaciones en la secuencia génica que conducen a un corte y empalme incorrectos. La expresión predominante de la proteína distrofina defectuosa o la falta completa de distrofina o de una proteína de tipo distrofina, conduce a una rápida progresión de la degeneración macular, tal como se ha indicado anteriormente. A este respecto, una proteína

distrofina “defectuosa” puede caracterizarse por las formas de distrofina que se producen en determinados sujetos con DMD o DMB, tal como es conocido en la técnica, o por la ausencia de distrofina detectable.

La Tabla A proporciona una ilustración de los diversos dominios de distrofina, los residuos aminoácidos que comprenden dichos dominios, y los exones que los codifican.

Tabla A:

dominio	subdominio	nº de residuo	Exones
dominio de unión a actina		14 a 240	2 a 8
dominio de barra central		253 a 3.040	8 a 61
	bisagra 1	253 a 327	(8)-9
	repetición 1	337 a 447	10 a 11
	repetición 2	448 a 556	12 a 14
	repetición 3	557 a 667	14 a 16
	bisagra 2	668 a 717	17
	repetición 4	718 a 828	(17)-20
	repetición 5	829 a 934	20 a 21
	repetición 6	935 a 1.045	22 a 23
	repetición 7	1.046 a 1.154	(23)-(26)
	repetición 8	1.155 a 1.263	26 a 27
	repetición 9	1.264 a 1.367	28-(30)
	repetición 10	1.368 a 1.463	30 a 32
	repetición 11	1.464 a 1.568	32-(34)
	repetición 12	1.569 a 1.676	34 a 35
	repetición 13	1.677 a 1.778	36 a 37
	repetición 14	1.779 a 1.874	38-(40)
	repetición 15	1.875 a 1.973	40 a 41
	interrupción	1.974 a 1.991	42
	repetición 16	1.992 a 2.101	42 a 43
	repetición 17	2.102 a 2.208	44 a 45
	repetición 18	2.209 a 2.318	46 a 48
	repetición 19	2.319 a 2.423	48 a 50
	bisagra 3	2.424 a 2.470	50 a 51
	repetición 20	2.471 a 2.577	51 a 53
	repetición 21	2.578 a 2.686	53-(55)
	repetición 22	2.687 a 2.802	55-(57)
	repetición 23	2.803 a 2.931	57 a 59
	repetición 24	2.932 a 3.040	59-(61)
	bisagra 4	3.041 a 3.112	61 a 64
dominio rico en cisteínas		3.080 a 3.360	63 a 69
	sitio de unión a distroglicano	3.080 a 3.408	63 a 70
	dominio WW	3.056 a 3.092	62 a 63
	EF-hand 1	3.130 a 3.157	65
	EF-hand 2	3.178 a 3.206	65 a 66
	dominio ZZ	3.307 a 3.354	68 a 69
dominio carboxi-terminal		3.361 a 3.685	70 a 79
	sitio de unión a alfa1-sintrofina	3.444 a 3.494	73 a 74
	sitio de unión a beta1-sintrofina	3.495 a 3.535	74 a 75
	repetición (Leu)6-héptada	3.558 a 3.593	75

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

Una proteína distrofina “funcional” se refiere de manera general a una proteína distrofina con suficiente actividad biológica para reducir la degradación progresiva del tejido muscular que, de otro modo, es característica de la distrofia muscular, típicamente en comparación con la forma alterada o “defectuosa” de proteína distrofina que se encuentra presente en determinados sujetos con DMD o DMB. En determinadas realizaciones, una proteína distrofina funcional puede presentar aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% (incluyendo todos los números enteros entre los porcentajes) de la actividad biológica *in vitro* o *in vivo* de la distrofina

de tipo salvaje, medida según técnicas rutinarias de la técnica. A título de ejemplo, la actividad relacionada con la distrofina en cultivos musculares *in vitro* puede medirse según el tamaño de miotubos, la organización (o desorganización) de miofibrillas, la actividad contráctil, y aglomeración espontánea de receptores de acetilcolina (ver, p.ej., Brown et al., *Journal of Cell Science*, 112:209-216, 1999). Los modelos animales también son recursos valiosos para estudiar la patogénesis de la enfermedad y proporcionar un medio para someter a ensayo 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 la distrofia muscular en el perro Golden Retriever (GRMD, por sus siglas en inglés), ambos son negativos para la distrofina (ver, p.ej., Collins y Morgan, *Int. J. Exp. Pathol.* 84: 165-172 (2003)]. Estos modelos animales y otros pueden utilizarse para medir la actividad funcional de diversas proteínas distrofina. Se incluyen formas truncadas de la distrofina, tales como aquellas formas que son producidas por algunos determinados de los compuestos antisentido de omisión exónica de la presente invención.

El término "gen" se refiere a una unidad de la herencia que ocupa un locus específico en un cromosoma y que consiste en secuencias reguladoras de la transcripción y/o traducción y/o una región codificante y/o secuencias no traducidas (es decir, intrones, secuencias no traducidas 5' y 3').

El término "aislado" se refiere a material que se encuentra sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, puede referirse a un polinucleótido que ha sido purificado o eliminado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural, p.ej., un fragmento de ADN que ha sido eliminado de las secuencias que normalmente son contiguas al fragmento.

El término "potenciar", "potenciación", "incremento" o "en incremento", "estimular" o "estimulante" se refiere de manera general a la capacidad de uno o más compuestos o composiciones antisentido de producir o provocar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos cadena abajo) en una célula o en un sujeto, en comparación con la respuesta causada por ningún compuesto antisentido o por un compuesto de control. Una respuesta fisiológica medible puede incluir la expresión incrementada de una forma funcional de una proteína distrofina, o una actividad biológica relacionada con distrofina incrementada en el tejido muscular, entre otras respuestas evidentes a partir de la comprensión de la técnica y las descripciones en la presente memoria. La función muscular incrementada también puede medirse, incluyendo incrementos o mejoras de la función muscular de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. El porcentaje de fibras musculares que expresa una distrofina funcional también puede medirse, incluyendo una expresión de distrofina incrementada en aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de las fibras musculares. Por ejemplo, se ha demostrado que aproximadamente 40% de la mejora de la función muscular puede producirse si 25% a 30% de las fibras expresan distrofina (ver, p.ej., DelloRusso et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 12.979-12.984, 2002). Una cantidad "incrementada" o "potenciada" típicamente es una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un incremento que es 1,1 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces (p.ej., 500 o 1.000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre ellos y superiores a 1), p.ej., 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por ningún compuesto antisentido (la ausencia de un agente) o por un compuesto de control.

El término "reducir" o "inhibir" puede referirse de manera general a la capacidad de uno o más compuestos antisentido de la invención de "reducir" una respuesta fisiológica o celular relevante, tal como un síntoma de una enfermedad o condición descrita en la presente memoria, medida según técnicas rutinarias en la técnica diagnóstica. Las respuestas fisiológicas o celulares relevantes (*in vivo* o *in vitro*) resultarán evidentes para el experto en la materia y pueden incluir reducciones de los síntomas o patología de la distrofia muscular, o reducciones de la expresión de formas defectuosas de la distrofina, tales como las formas alteradas de la distrofina que se expresan en los individuos con DMD o DMB. Una "reducción" en una respuesta puede ser estadísticamente significativa en comparación con la respuesta producida por la falta de compuesto antisentido o por una composición de control, y puede incluir una reducción de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%, incluyendo todos los números enteros entre estos porcentajes.

El término "homología" se refiere al porcentaje del número de aminoácidos que son idénticos o que constituyen sustituciones conservadoras. La homología puede determinarse utilizando programas de comparación de secuencias, tales como GAP (Deveraux et al., *Nucleic Acids Research* 12:387-395, 1984). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en la presente memoria pueden compararse mediante la inserción de huecos en la alineación, determinando dichos huecos, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

La utilización de la expresión "identidad de secuencias" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia 50% idéntica a", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la medida en que las secuencias son idénticas nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido a lo largo de una ventana de comparación. De esta manera, se calcula un "porcentaje de identidad de secuencias" mediante la comparación de dos secuencias óptimamente alineadas dentro

de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se observa la base ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G o I) o el residuo aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, m Gln, Cys y Met) en ambas secuencias, rindiendo el número de posiciones correspondientes, dividiendo el número de posiciones correspondientes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencias.

Entre las expresiones utilizadas para describir las relaciones entre secuencias entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos se incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencias", "porcentaje de identidad de secuencias" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" presenta por lo menos 8 o 10, aunque frecuentemente 15 a 18, y con frecuencia por lo menos 25 unidades de monómero, incluyendo nucleótidos y residuos aminoácidos, de longitud. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender, cada uno, (1) una secuencia (es decir, sólo una parte de la secuencia polinucleótida completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones entre secuencias de dos (o más) polinucleótidos típicamente se llevan a cabo comparando las secuencias de los dos polinucleótidos a lo largo de una "ventana de comparación" con el fin de identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de por lo menos 6 posiciones contiguas, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más habitualmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150, en la que se compara una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de la alineación óptima de las dos secuencias. La ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de aproximadamente 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para la alineación de una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante implementaciones computerizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE.UU.) o mediante inspección y alineación óptima (es decir, que resulte en el porcentaje de homología más alto dentro de la ventana de comparación) generada mediante cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También puede hacerse referencia a la familia BLAST de programas, tal como se da a conocer, por ejemplo, en Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997). Puede encontrarse un comentario detallado del análisis de secuencias en la unidad 19.3 de Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1994-1998, capítulo 15.

El "tratamiento" o "tratar" un individuo (p.ej., un mamífero, tal como un ser humano) o una célula puede incluir cualquier tipo de intervención utilizada en un intento para alterar el curso natural del individuo o célula. El tratamiento incluye, aunque sin limitación, la administración de una composición farmacéutica y puede llevarse a cabo profilácticamente o después del inicio de un suceso patológico o el contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o condición asociada a la proteína distrofina, tal 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 condición bajo tratamiento. Se incluyen además tratamientos "profilácticos", que pueden dirigirse a reducir la velocidad de progresión de la enfermedad o condición bajo tratamiento, a retrasar la aparición de la enfermedad o condición, o a reducir la gravedad de su aparición. El "tratamiento" o "profilaxis" no indica necesariamente la erradicación completa, cura o prevención de la enfermedad o condición, o síntomas asociados a la misma.

Por lo tanto, se incluyen uno o más oligonucléotidos antisentido de la presente invención (por ejemplo, SEC ID no 287, y variantes de los mismos) opcionalmente como parte de una formulación farmacéutica o forma de administración para uso en el tratamiento de distrofia muscular en un sujeto en necesidad de lo mismo. También se incluyen uno o más oligonucléotidos antisentido para usarse en la inducción de la omisión del exón 50 en el cual el exón es el exón 50 del gen de distrofina humana. Un "sujeto", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye cualquier animal que muestra un síntoma, o se encuentra en riesgo de mostrar un síntoma, que puede tratarse con un compuesto antisentido de la invención, tal como un sujeto que presenta o está en riesgo de presentar DMD o DMB, o cualquiera de los síntomas asociados a estas condiciones (p.ej., pérdida de fibras musculares). Entre los sujetos (pacientes) adecuados se incluyen animales de laboratorio (tales como el ratón, la rata, el conejo o el cobaya), animales de granja y animales domésticos o de compañía (tales como un gato o perro). Se encuentran incluidos los primates no humanos y, preferentemente, los pacientes humanos.

También se incluyen sistemas vectores de administración que son capaces de expresar las secuencias oligoméricas con diana en la distrofina de la presente invención, tales como vectores que expresan una secuencia polinucleótida que comprende SEC ID nº 287, o variantes de la misma, tal como se indica en la presente memoria. El término "vector" o "constructo de ácido nucleico" se refiere a una molécula polinucleótida, preferentemente una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, levadura o virus, en la que puede insertarse o clonarse un polinucleótido. Un vector preferentemente contiene uno o más sitios de restricción únicos y puede ser capaz de replicación autónoma en una célula huésped definida, incluyendo una célula o tejido diana o una célula o tejido progenitor del mismo, o ser integrable en el genoma del huésped definido de manera que la secuencia clonada sea reproducible. De acuerdo con lo anterior, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe en forma de una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación

cromosómica, por ejemplo un plásmido circular lineal o cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualesquiera medios para garantizar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, al ser introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado.

- 5 Un sistema vector o constructo de ácido nucleico puede comprender un único vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total que debe introducirse en el genoma de la célula huésped, o un transposón. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que debe introducirse el vector. En el presente caso, el vector o constructo de ácido nucleico preferentemente es 10 uno que es operablemente funcional en una célula de mamífero, tal como una célula muscular. El vector puede incluir, además, un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a antibiótico o fármaco, o un gen informador (es decir, proteína fluorescente verde, luciferasa) que puede utilizarse para la selección o identificación de transformantes o transfectantes adecuados. Entre los sistemas de administración ejemplares pueden incluirse 15 sistemas de vector vírico (es decir, transducción mediada víricamente), incluyendo, aunque sin limitación, vectores retrovíricos (p.ej., lentivíricos), vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados y vectores víricos herpes, entre otros conocidos en la técnica.

La expresión "operablemente ligado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a introducir una secuencia codificante de oligómero bajo el control regulador de un promotor, que entonces controla la transcripción del 20 oligómero.

Un gen o producto génico de tipo salvaje es aquel que se observa más frecuentemente en una población y se denomina arbitrariamente, de esta manera, forma "normal" o "de tipo salvaje" del gen.

25 "Alquilo" o "alquileno" se refieren ambos a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada saturada que contiene 1 a 18 carbonos. Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, terc-butilo, n-pentilo y n-hexilo. La expresión "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo, tal como se define en la presente memoria, que contiene entre 1 y 8 carbonos.

30 El término "alquenilo" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada insaturado que contiene 2 a 18 carbonos y que comprende por lo menos un doble enlace carbono a carbono. Entre los ejemplos se incluye, aunque sin limitación, etenilo, propenilo, isopropenilo, butenilo, isobutenilo, terc-butenilo, n-pentenilo y n-hexenilo. La expresión "alquenilo inferior" se refiere a un grupo alquenilo, tal como se define en la presente memoria, que contiene entre 2 y 8 carbonos.

35 El término "alquinilo" se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada insaturado que contiene 2 a 18 carbonos que comprende por lo menos un triple enlace carbono a carbono. Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, etinilo, propinilo, isopropinilo, butinilo, isobutinilo, terc-butinilo, pentinilo y hexinilo. La expresión "alquinilo inferior" se refiere a un grupo alquinilo, tal como se define en la presente memoria, que contiene entre 2 y 8 carbonos.

40 El término "cicloalquilo" se refiere a un radical alquilo monocíclico o policíclico. Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

45 El término "arilo" se refiere a una fracción de hidrocarburo aromático cíclico que contiene 5 a 18 carbonos con uno o más anillos cerrados. Entre los ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, fenilo, bencilo, naftilo, antracenilo, fenantracenilo y bifenilo.

50 El término "aralquilo" se refiere a un radical de fórmula RaRb en la que Ra es una cadena alquenilo tal como se ha definido anteriormente y Rb es uno o más radicales arilo tal como se ha definido anteriormente, por ejemplo bencilo, difenilmetilo y similares.

55 El término "tioalcoxi" se refiere a un radical de fórmula -SRc, en la que Rc es un radical alquilo tal como se define en la presente memoria. La expresión "tioalcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi, tal como se define en la presente memoria, que contiene entre 1 y 8 carbonos.

60 El término "alcoxi" se refiere a un radical de fórmula -ORd, en la que Rd es un radical alquilo tal como se define en la presente memoria. La expresión "alcoxi inferior" se refiere a un grupo alcoxi, tal como se define en la presente memoria, que contiene entre 1 y 8 carbonos. Entre los ejemplos de grupos alcoxi se incluyen, aunque sin limitación, metoxi y etoxi.

El término "alcoxialquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi.

El término "carbonilo" se refiere al radical -C(=O)-.

65 El término "guanidinilo" se refiere al radical H₂N(C=NH₂)-NH-.

El término "amidinilo" se refiere al radical H₂N(C=NH₂)CH-.

El término "amino" se refiere al radical -NH₂.

- 5 El término "alquilamino" se refiere a un radical de fórmula -NHRd o -NRdRd, en la que cada Rd es, independientemente, un radical alquilo tal como se define en la presente memoria. La expresión "alquilamino inferior" se refiere a un grupo alquilamino, tal como se define en la presente memoria, que contiene entre 1 y 8 carbonos.
- 10 El término "heterociclo" se refiere a un anillo monocíclico de 5 a 7 elementos, o bicíclico heterocíclico de 7 a 10 elementos, que es saturado, insaturado o aromático y que contiene 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden oxidarse opcionalmente, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriormente indicados se fusiona con un anillo de benceno. El heterociclo puede unirse mediante cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Entre los heterociclos se incluyen heteroarilos tal como se define posteriormente. De esta manera, además de los heteroarilos listados posteriormente, entre los heterociclos se incluyen además morfolinilo, pirrolidinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.
- 15 20 El término "heteroarilo" se refiere a un anillo heterociclo aromático de 5 a 10 elementos y que presenta por lo menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre y que contiene por lo menos 1 átomo de carbono, incluyendo tanto sistemas de anillos monocíclicos como bicíclicos. Son heteroarilos representativos, piridilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, bencimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo y quinazolinilo.
- 25 30 35 40 45 Las expresiones "alquilo sustituido opcionalmente", "alquenilo sustituido opcionalmente", "alcoxi sustituido opcionalmente", "tioalcoxi sustituido opcionalmente", "alquilamino sustituido opcionalmente", "alquilo inferior sustituido opcionalmente", "alquenilo inferior sustituido opcionalmente", "alcoxi inferior sustituido opcionalmente", "tioalcoxi inferior sustituido opcionalmente", "alquilamino inferior sustituido opcionalmente" y "heterociclico sustituido opcionalmente" se refieren a que, al sustituirlos, por lo menos un átomo de hidrógeno se sustituye con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O), se sustituyen dos átomos de hidrógeno. A este respecto, entre los sustituyentes se incluyen deuterio, alquilo sustituido opcionalmente, alquenilo sustituido opcionalmente, alquinilo sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclo sustituido opcionalmente, cicloalquilo sustituido opcionalmente, oxo, halógeno, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO₂Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOMRx y -SOMNRxRy, en los que m es 0, 1 o 2, Rx y Ry son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo sustituido opcionalmente, alquenilo sustituido opcionalmente, alquinilo sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclo sustituido opcionalmente o cicloalquilo sustituido opcionalmente y cada uno de dichos sustituyentes alquilo sustituido opcionalmente, alquenilo sustituido opcionalmente, alquinilo sustituido opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente, heterociclo sustituido opcionalmente y cicloalquilo sustituido opcionalmente puede sustituirse adicionalmente con uno o más de oxo, halógeno, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO₂Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOMRx y -SOMNRxRy.
- 45 Construcción de oligonucleótidos antisentido
- 50 Se ilustran ejemplos de oligonucleótidos morfolino con enlaces esqueléticos que contienen fósforo en las figs. 1A-1C. Resulta especialmente preferente un oligonucleótido morfolino unido mediante fosforodiamidato tal como se muestra en la fig. 1C, que está modificado, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, para que contenga grupos cargados positivamente en preferentemente 10% a 50% de sus enlaces del esqueleto. Los oligonucleótidos morfolino con enlaces de esqueleto no cargados y su preparación, incluyendo los oligonucleótidos antisentido, se detallan en, por ejemplo, Summerton y Weller 1997, y en las patentes US copropietarias nº 5.698.685, nº 5.217.866, nº 5.142.047, nº 5.034.506, nº 5.166.315, nº 5.185.444, nº 5.521.063 y nº 5.506.337.
- 55 60 Entre las propiedades importantes de las subunidades a base de morfolino se incluyen: 1) la capacidad de estar unidas en una forma oligomérica mediante enlaces de esqueleto no cargados o cargados positivamente, 2) la capacidad de soportar una base nucleótida (p.ej., adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e inosina), de manera que el polímero formado puede hibridarse con un ácido nucleico diana de bases complementarias, incluyendo ARN diana, con valores de Tm superiores a aproximadamente 45°C en oligonucleótidos relativamente cortos (p.ej., 10 a 15 bases), 3) la capacidad del oligonucleótido de ser transportado activa o pasivamente al interior de células de mamífero, y 4) la capacidad del heterodúplex de oligonucleótido antisentido:ARN de resistir a ARNasa H y a la degradación por ARNasa H, respectivamente.
- 65 Entre las estructuras de esqueleto ejemplares para los oligonucleótidos antisentido de la materia objeto reivindicada se incluyen los tipos de subunidad morfolino mostrados en las figs. 1D-G, cada una unida mediante un enlace de

subunidad que contiene fósforo no cargado o cargado positivamente. La fig. 1D muestra un enlace que contiene fósforo que forma el esqueleto de unidad repetitiva de cinco átomos, en el que los anillos morfolino están unidos mediante un enlace fosfoamida de 1 átomo. La fig. 1E muestra un enlace que produce un esqueleto de unidades repetitivas de 6 átomos. En esta estructura, el átomo Y que une el carbono 5'-morfólico con el grupo de fósforo 5

puede ser de azufre, nitrógeno, carbono o, preferentemente, oxígeno. La fracción X colgante del fósforo puede ser de flúor, un alquilo o alquilo sustituido, un alcoxi o alcoxi sustituido, un tioalcoxi o tioalcoxi sustituido, o nitrógeno no sustituido, monosustituido o disustituido, incluyendo estructuras cíclicas, tales como morfolinos o piperidinas. Los alquilo, alcoxi y tioalcoxi preferentemente incluyen 1 a 6 átomos de carbono. Las fracciones Z son de azufre u 10 oxígeno, y preferentemente de oxígeno.

Los enlaces mostrados en las figs. 1F y 1g están diseñados para esqueletos de longitud unitaria de 7 átomos. En la 10 estructura 1F, la fracción X es tal como en la estructura 1E, y la fracción Y puede ser de metileno, azufre o, preferentemente, oxígeno. En la estructura 1G, las fracciones X e Y son tal como en la estructura 1E. Entre los 15 oligonucleótidos morfolino particularmente preferentes se incluyen los compuestos de estructuras de subunidades de morfolino de la forma mostrada en la fig. 1E, en la que X=NH₂, N(CH₃)₂, 1-piperazinilo sustituido opcionalmente u otro grupo cargado, Y=O y Z=O.

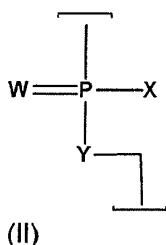
Tal como se ha indicado anteriormente, el oligonucleótido no cargado o sustancialmente no cargado puede 20 modificarse, de acuerdo con un aspecto de la invención, para incluir enlaces cargados, p.ej., hasta aproximadamente 1 por cada 2 a 5 enlaces no cargados, tal como aproximadamente 4 o 5 por cada 10 enlaces no cargados. Puede observarse una mejora óptima de la actividad antisentido en el caso de que aproximadamente 25% de los enlaces del esqueleto sean catiónicos, incluyendo aproximadamente 20% a aproximadamente 30%. También 25 se encuentran incluidos oligómeros en los que aproximadamente 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% (incluyendo todos los números enteros entre estos porcentajes) o más de los enlaces de esqueleto son catiónicos. También se observa una potenciación con un número pequeño, p.ej. 5% o 10% a 20%, de los enlaces catiónicos.

Un esqueleto que contiene fósforo sustancialmente no cargado en un análogo de oligonucleótido típicamente es uno 30 en el que la mayoría de los enlaces de subunidad, p.ej., 50% a 100%, típicamente por lo menos 60% a 100%, o 75% o 80% de sus enlaces, están no cargados a pH fisiológico y contienen un único átomo de fósforo.

Algunos experimentos adicionales llevados a cabo en apoyo de la presente invención indican que la potenciación 35 observada con cargas de esqueleto catiónicas añadidas puede, en algunos casos, potenciarse adicionalmente mediante la distribución de la mayor parte de las cargas en una zona próxima a la "región central" de los enlaces de esqueleto del oligonucleótido antisentido, p.ej., en un oligonucleótido 20-mero con 8 enlaces de esqueleto catiónico, con por lo menos 70% de estos enlaces cargados localizados en los 10 enlaces más centrales.

Los compuestos antisentido pueden prepararse mediante síntesis en fase sólida escalonada, utilizando métodos 40 detallados en las referencias citadas anteriormente, y posteriormente con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que presentan una mezcla de enlaces de esqueleto no cargados y catiónicos. En algunos casos, puede resultar deseable añadir fracciones químicas adicionales al compuesto antisentido, p.ej., para potenciar la farmacocinética o para facilitar la captura o detección del compuesto. Tal fracción puede unirse covalentemente, típicamente a un extremo del oligómero, según métodos sintéticos estándares. Por ejemplo, la adición de una fracción polietilenenglicol u otro polímero hidrofílico, p.ej., uno con 10 a 100 subunidades monoméricas, puede resultar útil en potenciar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, p.ej., grupos cargados aniónicos, tales como un ácido orgánico, pueden 45 potenciar la incorporación celular. Una fracción informadora, tal como fluoresceína o un grupo marcado radioactivamente, puede unirse con fines de detección. Alternativamente, la etiqueta informadora unida al oligómero puede ser un ligando, tal como un antígeno o biotina, capaz de unirse a un anticuerpo marcado o estreptavidina. En la selección de una fracción para la unión o modificación de un compuesto antisentido, generalmente resulta deseable evidentemente seleccionar compuestos químicos de grupos que son biocompatibles y probablemente 50 tolerados por un sujeto sin efectos secundarios no deseables.

Tal como se ha indicado anteriormente, el compuesto antisentido puede construirse para contener un número 55 seleccionado de enlaces catiónicos intercalados con enlaces no cargados del tipo indicado anteriormente. Los enlaces intersubunidad, tanto no cargados como catiónicos, preferentemente son enlaces que contienen fósforo, con la estructura (II):



en la que:

W es -S- o -O-, y preferentemente es -O-,

X = -NR¹R² o -OR⁶,

Y = -O- o -NR⁷, y

cada uno de dichos enlaces en el oligómero se selecciona de:

(a) un enlace no cargado (a), en el que cada uno de R¹, R², R⁶ y R⁷ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior,

(b1) un enlace catiónico (b1), en el que X = -NR¹R² e Y = -O-, y -NR¹R² representan una fracción piperazinilo sustituida opcionalmente, de manera que R¹R² = -CHRCHRN(R³)(R⁴)CHRCHR-, en el que:

cada R es independientemente H o -CH₃,

R⁴ es H, -CH₃, o un par de electrones, y

R³ se selecciona de H, alquilo inferior sustituido opcionalmente, -C(=NH)NH₂, -Z-L-NHC(=NH)NH₂, y [-C(=O)CHR'NH]_mH, en el que: Z es -C(=O)- o un enlace directo, L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente de hasta 12 átomos, y más preferentemente de hasta 8 átomos de longitud, con enlaces seleccionados de alquilo sustituido opcionalmente, alcoxi sustituido opcionalmente y alquilamino sustituido opcionalmente, R' es una cadena lateral de un aminoácido natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es 1 a 6, preferentemente 1 a 4,

(b2) un enlace catiónico (b2), en el que X = -NR¹R² e Y = -O-, R¹ = H o -CH₃, y R² = LNR³R⁴R⁵, en el que L, R³, y R⁴ son tal como se ha definido anteriormente, y R⁵ es H, alquilo inferior sustituido opcionalmente o alquilo(alcoxi) inferior sustituido opcionalmente, y

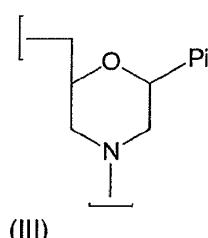
(b3) un enlace catiónico (b3), en el que Y = -NR⁷ y X = -OR⁶, y R⁷ = -LNR³R⁴R⁵, en el que L, R³, R⁴ y R⁵ son tal como se ha definido anteriormente, y R⁶ es H o alquilo inferior sustituido opcionalmente, y por lo menos uno de dichos enlaces se selecciona de los enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3).

Preferentemente, el oligómero incluye por lo menos dos enlaces consecutivos de tipo (a) (es decir, enlaces no cargados). En realizaciones adicionales, por lo menos 5% de los enlaces en el oligómero son enlaces catiónicos (es decir, de tipo (b1), (b2) o (b3)), por ejemplo 10% a 60%, y preferentemente 20% a 50% de los enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

En una realización, por lo menos un enlace es de tipo (b1), en el que, preferentemente, cada R es H, R⁴ es H, -CH₃, o un par de electrones, y R³ se selecciona de H, alquilo inferior sustituido opcionalmente, -C(=NH)NH₂, y -C(=O)-L-NHC(=NH)NH₂. Las dos últimas realizaciones de R³ proporcionan una fracción guanidino, directamente unida al anillo piperazina o colgante de un grupo conector L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la variable Z en R³ preferentemente es -C(=O)-, tal como se muestra.

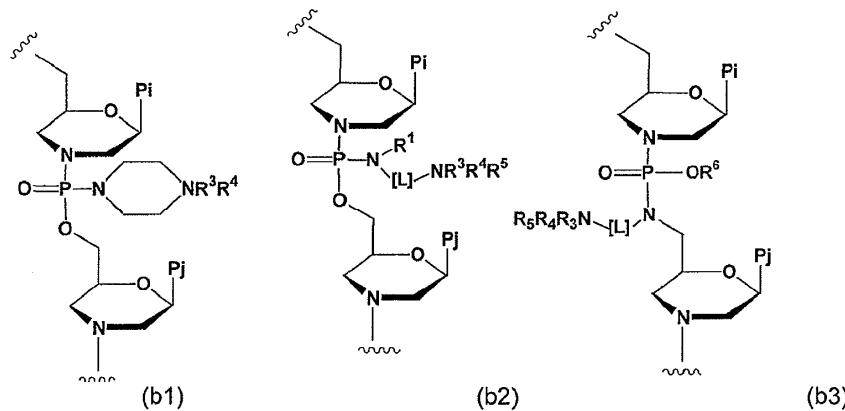
El grupo conector L, tal como se ha indicado anteriormente, contiene enlaces en su esqueleto seleccionados de alquilo sustituido opcionalmente, alcoxi sustituido opcionalmente y alquilamino sustituido opcionalmente, en el que los átomos terminales en L (p.ej., los contiguos a carbonilo o nitrógeno) son átomos de carbono. Aunque resultan posibles los enlaces ramificados, el conector preferentemente es no ramificado. En una realización, el conector es un conector alquilo lineal. Dicho conector puede presentar la estructura -(CH₂)_n- , en la que n es 1 a 12, preferentemente 2 a 8, y más preferentemente 2 a 6.

Las subunidades morfolino presentan la estructura (III) a continuación:



en la que Pi es una fracción de apareamiento de bases y los enlaces ilustrados anteriormente conectan el átomo de nitrógeno de (III) con el carbono 5' de una subunidad contigua. Las fracciones de apareamiento de bases Pi pueden ser iguales o diferentes y se diseñan generalmente para proporcionar una secuencia que se une a un ácido nucleico diana.

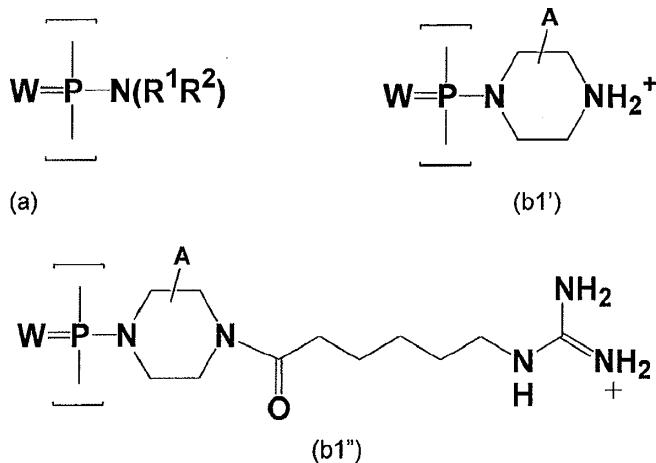
La utilización de realizaciones de los tipos de enlace (b1), (b2) y (b3), anteriormente, para unir las subunidades morfolino (III) pueden ilustrarse gráficamente de la manera siguiente:



- 5 Preferentemente, todos los enlaces catiónicos en el oligómero son del mismo tipo; es decir, todos del tipo (b1), todos del tipo (b2) o todos del tipo (b3).

En realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos se seleccionan de los enlaces (b1') y (b1'') tal como se muestra posteriormente, en donde (b1') se denomina en la presente memoria enlace "Pip" y (b1'') se denomina en la presente memoria enlace "GuX":

10



- 15 En las estructuras anteriores, W es S o O, y es preferentemente O; cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior sustituido opcionalmente, y es preferentemente metilo, y A representa hidrógeno o un sustituyente no interferente (es decir, un sustituyente que no afecta adversamente a la capacidad de un oligómero de unirse a su diana pretendida) en uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferentemente, los carbonos anulares en el anillo piperazina están no sustituidos; sin embargo, los carbonos anulares del anillo piperazina pueden incluir sustituyentes no interferentes, tales como metilo o flúor. Preferentemente, como máximo uno o dos átomos de carbono se sustituyen de esta manera.

En realizaciones adicionales, por lo menos 10% de los enlaces son de tipo (b1') o (b1''); por ejemplo 10% a 60% y preferentemente 20% a 50% de los enlaces pueden ser de tipo (b1') o (b1'').

En otras realizaciones, el oligómero no contiene enlaces del tipo $(b1')$ anterior. Alternativamente, el oligómero no contiene enlaces de tipo $(b1)$, en el que cada R es H , R^3 es H o $-CH_2-$, y R^4 es H , $-CH_2-$ o un par de electrones.

30 Las subunidades morfolino también pueden unirse mediante enlaces intersubunidad no basados en fósforo, tal como se indica adicionalmente después, donde por lo menos un enlace se modifica con un grupo catiónico colgante, tal como se ha indicado anteriormente.

35 Podrían utilizarse otros enlaces de análogo de oligonucleótido que se encuentran no cargados en su estado no modificado pero que también podrían portar un sustituyente amina colgante. Por ejemplo, podría utilizarse un átomo de nitrógeno 5' en un anillo morfolino en un enlace sulfamida o en un enlace de urea (en el que el fósforo se sustituye por carbono o azufre, respectivamente) y modificarse de una manera análoga al átomo de nitrógeno 5' en la estructura (b3), anteriormente.

Se proporcionan oligómeros que presentan cualquier número de enlaces catiónicos, incluyendo oligómeros

totalmente unidos por enlaces catiónicos. Preferentemente, sin embargo, los oligómeros están parcialmente cargados, presentando, por ejemplo, 10% a 80%. En realizaciones preferentes, aproximadamente 10% a 60%, y preferentemente 20% a 50% de los enlaces son catiónicos.

- 5 En una realización, los enlaces catiónicos están entremezclados a lo largo del esqueleto. Los oligómeros parcialmente cargados preferentemente contienen por lo menos dos enlaces no cargados consecutivos; es decir, el oligómero preferentemente no presenta un patrón estrictamente alternante a lo largo de toda su longitud.
- 10 También se consideran los oligómeros que presentan bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces no cargados; por ejemplo, un bloque central de enlaces no cargados puede estar flanqueado por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero presenta aproximadamente una longitud equivalente 5', 3' y en regiones centrales, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región central es superior a aproximadamente 50%, preferentemente superior a aproximadamente 70%.
- 15 Los oligómeros para la utilización en la presente invención varían de longitud desde 20 a 35 subunidades, incluidos aquellos que tienen 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, o 35, bases.

Cada estructura de anillo morfolino presenta apoyo a una fracción de apareamiento de bases, formando una secuencia de fracciones de apareamiento de bases que está diseñada típicamente para hibridarse con una diana antisentido seleccionada en una célula o en sujeto bajo tratamiento. La fracción de apareamiento de bases puede ser una purina o pirimidina presente en ADN o ARN nativo (p.ej., A, G, C, T o U) o un análogo, tal como hipoxantina (el componente de bases del nucleósido inosina) o 5-metil-citosina.

Transportadores de péptidos

- 25 Los compuestos antisentido de la invención pueden incluir una fracción oligonucleótido conjugada con una fracción de transporte de péptidos ricos en arginina eficaz para potenciar el transporte del compuesto hacia el interior de las células. La fracción de transporte preferentemente se une a un extremo terminal del oligómero, tal como se muestra, por ejemplo, en las figuras 1B y 1C. La fracción de transporte peptídico preferentemente comprende 6 a 16 subunidades seleccionadas de subunidades X', subunidades Y' y subunidades Z', en la que:
- 30 (a) cada subunidad X' representa independientemente lisina, arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α-aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura R¹N=C(NH₂)R², en la que R¹ es H o R; R² es R, -NH₂, -NHR, o -NR₂, en la que R es alquilo inferior sustituido opcionalmente o alquenilo inferior sustituido opcionalmente; R¹ y R² pueden unirse entre sí para formar un anillo, y la cadena lateral se une a dicho aminoácido mediante R¹ o R²;
- 35 (b) cada subunidad Y' representa independientemente un aminoácido neutro -C(=O)-(CHR)_n-NH-, donde n es 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo, y
- 40 (c) cada subunidad Z' representa independientemente un α-aminoácido que presenta una cadena lateral aralquilo neutra,

en la que el péptido comprende una secuencia representada por lo menos uno de (X'Y'X')_p, (X'Y')_m, y/o (X'Z'Z')_p, donde p es 2 a 5 y m es 2 a 8. Determinadas realizaciones incluyen diversas combinaciones seleccionadas independientemente de (X'Y'X')_p, (X'Y')_m y/o (X'Z'Z')_p, incluyendo, por ejemplo, péptidos que presentan la secuencia (X'Y'X')(X'Z'Z')(X'Y'X')(X'Z'Z') (SEC ID nº 637).

45 En realizaciones seleccionadas, para cada X', la fracción de cadena lateral es guanidinilo, tal como en la subunidad aminoácido arginina (Arg). En determinadas realizaciones, cada Y' es independientemente -C(=O)-(CH₂)_n-CHR-NH-, donde n es 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, en el caso de que n sea 5 y R sea H, Y' es una subunidad ácido 6-aminohexanoico, abreviadamente en la presente memoria Ahx; en el caso de que n sea 2 y R sea H, Y' es una subunidad β-alanina, abreviada en la presente memoria B. Determinadas realizaciones se refieren a péptidos portadores que presentan una combinación de diferentes aminoácidos neutros, incluyendo, por ejemplo, péptidos que comprenden la secuencia -RahxRRBRRAhxRRBRAhxB- (SEC ID nº 578), que contiene tanto β-alanina como ácido 6-aminohexanoico.

- 50 Entre los péptidos preferentes de este tipo se incluyen los que comprenden dímeros de arginina alternantes con subunidades Y' individuales, en las que Y' preferentemente es Ahx o B, o ambos. Entre los ejemplos se incluyen péptidos que presentan la fórmula (RY'R)_p y/o la fórmula (RRY')_p, en la que p es 1 a 2 a 5 y en la que Y' es preferentemente Ahx. En una realización, Y' es una subunidad ácido 6-aminoheanoico, R es arginina y p es 4.
- 55 Determinadas realizaciones incluyen diversas combinaciones lineales de por lo menos dos de (RY'R)_p y (RRY')_p, incluyendo, por ejemplo, péptidos ilustrativos que presentan la secuencia (RY'R)(RRY')(RY'R)(RRY') (SEC ID nº 638), o (RRY')(RY'R)(RRY') (SEC ID nº 639). Se encuentran contempladas otras combinaciones. En una realización ilustrativa adicional, cada Z' es fenilalanina, y m es 3 o 4.

- 60 65 El péptido conjugado preferentemente se une a un extremo del oligómero mediante un conector Ahx-B, en el que

Ahx es una subunidad ácido 6-aminoheanoico y B es una subunidad β -alanina, tal como se muestra, por ejemplo, en las figs. 1B y 1C.

- En realizaciones seleccionadas, para cada X', la fracción de cadena lateral se selecciona independientemente del grupo que consiste en guanidinil (HN=C(NH₂)NH-), amidinilo (HN=C(NH₂)CH-), 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo y se selecciona preferentemente de guanidinilo y amidinilo. En una realización, la fracción cadena lateral es guanidinilo, tal como en la subunidad aminoácido arginina (Arg).
- En determinadas realizaciones, las subunidades Y' pueden ser contiguas, ya que no hay subunidades X' intermedias entre las subunidades Y' o entremezcladas individualmente entre subunidades X'. En determinadas realizaciones, la subunidad de enlace puede encontrarse entre subunidades Y'. En una realización, las subunidades Y' se encuentran en un extremo del transportador; en otras realizaciones, se encuentran flanqueadas por subunidades X'. En realizaciones preferentes adicionales, cada Y' es -C(=O)-(CH₂)_n-CHR-NH-, donde n es 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, en el caso de que n sea 5 y R sea H, Y' es una subunidad ácido 6-aminohexanoico, abreviada en la presente memoria Ahx. En realizaciones seleccionadas de este grupo, cada X' comprende una fracción de cadena lateral guanidinilo, tal como en una subunidad arginina. Entre los péptidos preferentes de este tipo se incluyen los que comprenden dímeros de arginina alternantes con subunidades Y' individuales, en las que Y' preferentemente es Ahx. Entre los ejemplos se incluyen péptidos que presentan la fórmula (RY'R)₄ o la fórmula (RRY')₄, en la que Y' es preferentemente Ahx. En el último caso, el análogo de ácido nucleico preferentemente se une a una subunidad Y' terminal, preferentemente en el extremo C-terminal, tal como se muestra, por ejemplo, en las figs. 1B y 1C. El conector preferente es de la estructura AhxB, en la que Ahx es una subunidad ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad β -alanina.
- Las fracciones de transportador indicadas anteriormente se ha demostrado que potencian en gran medida la entrada en la célula de oligómeros unidos, respecto a la incorporación del oligómero en ausencia de la fracción de transporte unida y respecto a la incorporación por una fracción de transporte unida que no presenta las subunidades hidrofóbicas Y'. Dicha incorporación potencia preferentemente se pone de manifiesto por un incremento de como mínimo dos veces y preferentemente por un incremento de cuatro veces en la incorporación del compuesto en las células de mamífero respecto a la incorporación del agente por una fracción de transporte unida que no presenta las subunidades hidrofóbicas Y'. La incorporación preferentemente resulta potenciada por lo menos veinte veces y más preferentemente cuarenta veces, respecto al compuesto no conjugado.
- Un beneficio adicional de la fracción de transporte es su capacidad esperada de estabilizar un dúplex entre un compuesto antisentido y su secuencia de ácido nucleico diana, presumiblemente en virtud de la interacción electrostática entre la fracción de transporte cargada positivamente y el ácido nucleico cargado negativamente. El número de unidades cargadas en el transportador es inferior a 14, tal como se ha indicado anteriormente, y preferentemente de entre 8 y 11, ya que un número excesivamente elevado de subunidades cargadas puede conducir a una reducción de la especificidad de secuencia.
- La utilización de transportadores peptídicos ricos en arginina (es decir, péptidos de penetración celular) resulta particularmente útil en la práctica de la presente invención. Se ha demostrado que determinados transportadores de péptidos resultan altamente eficaces en la administración de compuestos antisentido en células primarias, incluyendo células musculares (Marshall, Oda et al. 2007; Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008). Además, en comparación con otros transportadores de péptidos, tales como Penetratin y el péptido Tat, los transportadores de péptidos indicados en la presente memoria, conjugados con un PMO antisentido, demuestran una capacidad potenciada de alterar el corte y empalme de varios transcritos génicos (Marshall, Oda et al., 2007). Resultan especialmente preferentes los péptidos de transporte P007, CP06062 y CP04057 listados posteriormente, en la Tabla 3 (SEC ID nº 573, 578 y 577, respectivamente).
- Los transportadores de péptidos ejemplares, incluyendo los conectores (B o AhxB) se proporcionan en la Tabla B a continuación. Las secuencias preferentes son las denominadas CP06062 (SEC ID nº 578), P007 (SEC ID nº 573) y CP04057 (SEC ID nº 577).

Tabla B. Transportadores de péptidos ejemplares para la administración intracelular de PMO

Secuencia	Peptídica (N-terminal a C-terminal)	SEC ID nº
rTAT	RRRQRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRFFC	571
(RRAhx) ₄ B	RRAhxRRAhxRRAhxRRAhx	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhx	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhx	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx	575
(RAhx) ₈ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhx	576
(RAhxR) ₅ AhxB (CP05057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRAhxRAhx	577

(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579

Formulaciones

- En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones o composiciones adecuadas para la administración terapéutica de oligómeros antisentido, tal como se describen en la presente memoria. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los oligómeros indicados en la presente memoria, formulados junto con uno o más portadores (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Aunque resulta posible que un oligómero de la presente invención se administre solo, resulta preferente administrar el compuesto en forma de una formulación (composición) farmacéutica.
- Los métodos para la administración de moléculas de ácidos nucleicos se describen en, por ejemplo, Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139 y Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al., PCT WO 94/02595. Estos y otros protocolos pueden utilizarse para la administración de virtualmente cualquier molécula de ácidos nucleicos, incluyendo los oligómeros aislados de la presente invención.
- Tal como se detalla posteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse especialmente para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pistolas dosificadoras (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), tabletas, p.ej., las destinadas a la absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para la aplicación en la lengua, (2) administración parenteral, por ejemplo mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural, tales como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida, (3) aplicación tópica, por ejemplo como crema, pomada o un parche de liberación controlada o spray aplicado en la piel, (4) intravaginalmente o intrarectalmente, por ejemplo como pesario, crema o espuma, (5) por vía sublingual, (6) por vía ocular, (7) por vía transdérmica o (8) por vía nasal.
- La expresión "farmacéuticamente aceptable" se utiliza en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de administración que resultan, dentro del alcance del criterio médico razonable, adecuadas para la utilización en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.
- La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, adyuvante de fabricación (p.ej., lubricante, talco de magnesio, estearato de calcio o cinc, o ácido esteárico), o material encapsulante de solvente, implicado en llevar o transportar el compuesto de la invención de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada portador debe resultar "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el paciente.
- Entre algunos ejemplos de materiales que pueden servir como portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: (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 mantequilla de cacao y ceras de suppositorio, (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 tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio, (15) ácido algínico, (16) agua libre de pirógenos, (17) solución salina isotónica, (18) solución de Ringer, (19) alcohol etílico, (20) soluciones de pH tamponado, (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos, y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas utilizadas en formulaciones farmacéuticas.
- Entre los ejemplos no limitativos adicionales de agentes adecuados para la formulación con los oligómeros antisentido de la presente invención se incluyen: Ácidos nucleicos conjugados con PEG, ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos, ácidos nucleicos que contienen fracciones lipofílicas, fosforotioatos, inhibidores de glucoproteína P (tales como Pluronic P85) que pueden potenciar la entrada de fármacos en diversos tejidos; polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(DL-láctido-coglicólido) para la administración de liberación sostenida después de la implantación (Emerich D.F. et al., Cell Transplant 8:47-58, 1999; Alkermes, Inc., Cambridge, Mass., y nanopartículas cargadas, tales como las realizadas en polibutilcianocrilato, que pueden administrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de incorporación neuronal (Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 23:941-949, 1999).
- La invención proporciona además la utilización de la composición que comprende liposomas de superficie modificada que contienen lípidos poli(etilenglicol) (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o

combinaciones de los mismos, o liposomas de circulación prolongada o liposomas encubiertos). Los oligómeros de la invención pueden comprender además moléculas de PEG unidas covalentemente de diversos pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para incrementar la acumulación de fármacos en los tejidos diana. Esta clase de portadores farmacológicos resiste la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES, por sus siglas en inglés), permitiendo de esta manera tiempos de circulación en sangre más prolongados y una exposición potenciada de los tejidos al fármaco encapsulado (Lasic et al., Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 43:1005-1011, 1995). Tales liposomas se ha demostrado que se acumulan selectivamente en los tumores, presumiblemente mediante extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic et al., Science 267:1275-1276, 1995; Oku et al., Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90, 1995). Los liposomas de circulación prolongada potencian la farmacocinética y farmacodinámica del ADN y ARN, en particular en comparación con liposomas catiónicos convencionales que es conocido que se acumulan en tejidos del MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 42:24864-24870, 1995; Choi et al., publicación de patente internacional PCT nº WO 96/10391; Ansell et al., publicación de patente internacional PCT nº WO 96/10390; Holland et al., publicación de patente internacional PCT nº WO 96/10392). Los liposomas de circulación prolongada también es probable que protejan los fármacos frente a la degradación por nucleasas en mayor grado que los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad de evitar la acumulación en tejidos MPS metabólicamente agresivos, tales como el hígado y el bazo.

En una realización adicional, la presente invención incluye composiciones de oligómeros preparadas para la administración tal como se describe en las patentes US nº 6.692.911, nº 7.163.695 y nº 7.070.807. A este respecto, en una realización, la presente invención proporciona un oligómero de la presente invención en una composición que comprende copolímeros de lisina e histidina (HK) tal como se indica en las patentes US nº 7.163.695, nº 7.070.807 y nº 6.692.911, solas o en combinación con PEG (p.ej., PEG ramificado o no ramificado, o una mezcla de ambos), en combinación con PEG y una fracción de transporte dirigido o cualquiera de los anteriores en combinación con un agente de entrecruzamiento. En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona oligómeros antisentido en composiciones que comprenden polihistidina modificada con ácido glucónico o polihistidina gluconilada/transferrina-polilisina. El experto en la materia reconocerá además que pueden sustituirse en la composición aminoácidos con propiedades similares a His y Lys.

Determinadas realizaciones de los oligómeros indicados en la presente memoria pueden contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino, y son capaces, de esta manera, de formar sales farmacéuticamente aceptables: con ácidos farmacéuticamente aceptables. A este respecto, la expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales de adición de ácido inorgánico y orgánico relativamente no tóxicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* en el vehículo de administración o en el procedimiento de fabricación de forma de dosificación, o haciendo reaccionar separadamente un compuesto purificado de la invención en su forma base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal formada de esta manera durante la purificación posterior. Entre las sales representativas se incluyen las sales hidrobromuro, hidrocloruro, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y similares. (Ver, p.ej., Berge et al. "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977).

Entre las sales farmacéuticamente aceptables de los oligómeros de la invención se incluyen sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los compuestos, p.ej., de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, entre tales sales no tóxicas convencionales se incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos, tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares, y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos, tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, mágico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotónico y similares.

En determinadas realizaciones, los oligómeros de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, de esta manera, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a sales de adición de base inorgánica y orgánica relativamente no tóxicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* de manera similar en el vehículo de administración o procedimiento de fabricación de forma de dosificación, o haciendo reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amonio, o con una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria farmacéuticamente aceptable. Entre las sales alcalinas o alcalino-térreas representativas se incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares. Entre las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base se incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares (ver, p.ej., Berge et al., *supra*).

También pueden encontrarse presentes en las composiciones, agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato sódico y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes desmoldantes, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes.

- Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloruro de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceites, 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 etilén-diamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.
- Entre las formulaciones de la presente invención se incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal o sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualesquiera métodos bien conocidos de la técnica farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de administración individual variará según el huésped bajo tratamiento, así como del modo de administración particular. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de administración individual generalmente será aquella cantidad de un compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, en porcentaje, esta cantidad se encontrará comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferentemente de entre aproximadamente 5 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente de entre aproximadamente 10 por ciento y aproximadamente 30 por ciento.
- En determinadas realizaciones, una formulación de la presente invención comprende un excipiente seleccionado de ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes formadores de micela, p.ej., ácidos biliares y portadores poliméricos, p.ej., poliésteres y polianhídridos, y un oligómero de la presente invención. En determinadas realizaciones, una formulación anteriormente mencionada convierte en biodisponible por vía oral un oligómero de la presente invención.
- Entre los métodos para preparar estas formulaciones o composiciones se incluye la etapa de asociar un oligómero de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de manera uniforme e íntima un compuesto de la presente invención y portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y después, en caso necesario, conformando el producto.
- Las formulaciones de la invención adecuadas para la administración oral pueden encontrarse en forma de cápsulas, sellos, píldoras, tabletas, pastillas (utilizando una base saborizada, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos o en forma de una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o en forma de pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o en forma de colutorio y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como ingrediente activo. Un oligómero de la presente invención también puede administrarse en forma de un bolo, electuario o pasta.
- En formas de dosificación sólidas de la invención para la administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos, trociscos y similares), el ingrediente activo puede mezclarse con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) ligantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato sódico; (5) agentes de retardo de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y surfactantes, tales como poloxámero y laurilsulfato sódico; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y surfactantes no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico, estearato de cinc, estearato sódico, ácido esteárico y mezclas de los mismos; (10) agentes colorantes, y (11) agentes de liberación controlada, tales como crospovidona o etilcelulosa. En el caso de las cápsulas, tabletas y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender además agentes tamponadores. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden utilizarse como cargas en cápsulas llenas de gelatina blanda y dura utilizando excipientes tales como lactosa o azúcar de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.
- Una tableta puede prepararse mediante prensado o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas pueden prepararse utilizando ligante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil-celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrande (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica entrecruzada), agente activo en superficie o dispersante. Pueden prepararse tabletas moldeadas mediante el moldeo en un aparato adecuado de una mezcla del compuesto en polvo humectado con un diluyente líquido inerte.
- Las tabletas y otras formas de administración sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ranurarse opcionalmente o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica

de la formulación farmacéutica. También pueden formularse de manera que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo en el mismo utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímero, liposomas y/o microesferas. Pueden formularse para la liberación rápida, p.ej., liofilizarse. Pueden esterilizarse mediante, por ejemplo, filtración a través de un filtro de retención bacteriana o mediante la incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de la utilización. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificadores y pueden ser de una composición con la que liberan el ingrediente o ingredientes activos sólo, o preferentemente, en una determinada parte del tracto intestinal, opcionalmente de manera retardada. Entre los ejemplos de composiciones de inclusión que pueden utilizarse se incluyen sustancias poliméricas y ceras. El agente activo también puede encontrarse en forma microencapsulada, en caso apropiado, con uno o más de los excipientes anteriormente indicados.

Entre las formas de administración líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención se incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de administración líquidas pueden comprender diluyentes inertes utilizados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros solventes, agentes solubilizadores y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (por ejemplo aceites de semilla de algodón, de cacahuete, de maíz, de germen, de oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán y mezclas de los mismos.

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

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

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

Entre las formulaciones o formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un oligómero de la presente invención se incluyen polvos, sprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Los oligómeros activos pueden mezclarse bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable y con cualesquiera conservantes, tampones o propelentes que puedan resultar necesarios. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos.

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

Los parches transdérmicos presentan la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada de un oligómero de la presente invención en el cuerpo. Dichas formas de administración pueden prepararse mediante la disolución o dispersión del oligómero en el medio apropiado. Los intensificadores de absorción también pueden incrementarse para incrementar el flujo del agente a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersión del agente en una matriz de polímero o gel, entre otros métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más oligómeros de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles inmediatamente antes de la utilización, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor deseado o agentes de suspensión o espesantes. Entre los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Puede mantenerse la fluidez correcta, por

ejemplo mediante la utilización de materiales de recubrimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento de un tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante la utilización de tensioactivos.

- 5 Dichas composiciones pueden contener además adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. El bloqueo de la acción de los microorganismos sobre los oligómeros de la invención puede garantizarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, ácido fenol-sóblico y similares. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico y similares en las composiciones. Además, puede conseguirse la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.
- 10 En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, resulta deseable enlentecer la absorción del fármaco a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Ello puede conseguirse mediante la utilización de una suspensión líquida de material cristalino o amorfio con baja solubilidad en agua, entre otros métodos conocidos en la técnica. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su tasa de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se consigue mediante la disolución o suspensión del fármaco en un vehículo aceite.
- 15 20 Las formas de depósito inyectable se preparan mediante la formación de matrices de microcápsulas de los oligómeros de la invención en polímeros biodegradables, tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la proporción de oligómero a polímero y de la naturaleza del polímero particular utilizado, puede controlarse la tasa de liberación de oligómero. Entre los ejemplos de otros polímeros biodegradables se incluyen (poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones de depósito inyectable también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones, los cuales son compatibles con los tejidos corporales.
- 25 30 En el caso de que los oligómeros de la presente invención se administren como farmacéuticos en el ser humano y en animales, pueden administrarse de por sí o como composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,1% a 99% (más preferentemente 10% a 30%) de ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 Tal como se ha indicado anteriormente, las formulaciones o preparaciones de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Típicamente se administran mediante formas adecuadas a cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de tabletas o cápsulas, mediante inyección, inhalado, loción oftálmica, pomada, suppositorio, etc., la administración mediante inyección, infusión o inhalación; por vía tópica mediante loción o pomada, y por vía rectal mediante supositorios.
- 40 45 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitarse a las mismas, las inyecciones e infusiones intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, y la infusión.
- 50 55 Las expresiones "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente", tal como se utilizan en la presente memoria, se refieren a la administración de un compuesto, fármaco u otro material no directamente en el sistema nervioso central, de manera que entra en el sistema del paciente y, de esta manera, se somete al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo la administración subcutánea.
- 60 65 Con independencia de la vía de administración seleccionada, los oligómeros de la presente invención, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia. Los niveles reales de las dosis de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del ingrediente activo que resulte eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin resultar inaceptablemente tóxicos para el paciente.
- 65 70 El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del oligómero particular de la presente invención utilizado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el momento de la administración, la tasa de excreción o metabolismo del oligómero particular utilizado, la tasa y grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el oligómero particular utilizado, la edad, el sexo, el peso, la condición, el estado general de salud y la historia médica anterior del paciente bajo tratamiento, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.
- 75 Un médico o veterinario con conocimientos ordinarios en la materia podrá determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar las

- dosis de los compuestos de la invención utilizados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos con el fin de conseguir el efecto terapéutico deseado y gradualmente incrementar las dosis hasta conseguir el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores indicados anteriormente. Generalmente, la dosis intravenosa, intracerebroventricular y subcutánea de los compuestos de la presente invención para un paciente, utilizadas para los efectos indicados, se encontrarán comprendidas entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día.
- Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados durante el día, opcionalmente en formas de administración unitarias. En determinadas situaciones, la dosificación es una administración al día. En determinadas realizaciones, la dosificación es una o más administración cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, según se requiera, para mantener la expresión deseada de una proteína distrofina funcional.
- Las moléculas de ácidos nucleicos pueden administrarse en las células mediante una diversidad de métodos conocidos por las personas familiarizadas con la técnica, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, el encapsulado en liposomas, mediante ionoféresis, o mediante incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, tal como se indica en la presente memoria y es conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, puede utilizarse la tecnología de microemulsificación para mejorar la biodisponibilidad de los agentes farmacéuticos lipofílicos (insolubles en agua). Entre los ejemplos se incluye la trimetrina (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 y REV 5901 (Sheen, P. C., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Entre otros beneficios, la microemulsificación proporciona una biodisponibilidad mejorada mediante la dirección preferente de la absorción al sistema linfático en lugar del sistema circulatorio, que de esta manera evita el hígado y evita la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.
- En un aspecto de la invención, las formulaciones contienen micelas formadas a partir de un oligómero tal como se proporciona en la presente memoria y por lo menos un portador anfifílico, en el que las micelas presentan un diámetro medio inferior a aproximadamente 100 nm. Realizaciones más preferentes proporcionan micelas con un diámetro medio inferior a aproximadamente 50 nm y realizaciones todavía más preferentes proporcionan micelas con un diámetro medio inferior a aproximadamente 30 nm o incluso inferior a aproximadamente 20 nm.
- Aunque todos los portadores anfifílicos adecuados se encuentran contemplados, los portadores actualmente preferentes son generalmente los que presentan un estatus de generalmente-reconocidos-como-seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) y que pueden tanto solubilizar el compuesto de la presente invención y microemulsionarlo en un estadio posterior al entrar en contacto la solución con una fase acuosa compleja (tal como la observada en el tracto gastrointestinal humano). Habitualmente, los ingredientes anfifílicos que satisfacen estos requisitos presentan valores de EHL (equilibrio hidrofílico-lipofílico) de 2 a 20 y sus estructuras contienen radicales alifáticos de cadena lineal en el intervalo de C-6 a C-20. Son ejemplos los glicéridos grasos polietilenglicolizados y polietilenglicos.
- Entre los ejemplos de portadores anfifílicos se incluyen glicéridos de ácido graso polietilenglicolizado saturado y monoinsaturado, tales como los obtenidos a partir de diversos aceites vegetales total o parcialmente hidrogenados. Tales aceites pueden consistir ventajosamente en glicéridos de tri-, di- y mono-ácido graso y ésteres de di- y mono-polietilenglicol de los ácidos grasos correspondientes, incluyendo una composición de ácidos grasos particularmente preferente ácido cáprico 4-10%, ácido cáprico 3-9%, ácido láurico 40-50%, ácido mirístico 14-24%, ácido palmítico 4-14% y ácido esteárico 5-15%. Otra clase útil de portadores anfifílicos incluye sorbitán parcialmente esterificado y/o sorbitol, con ácidos grasos saturados o monoinsaturados (serie SPAN) o análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).
- Los portadores anfifílicos disponibles comercialmente pueden resultar particularmente útiles, incluyendo la serie Gelucire, labrafilo, labrasol o lauroglícol (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. (producidoss y distribuidos por varias compañías en EE.UU. y en todo el mundo).
- En determinadas realizaciones, la administración puede realizarse mediante la utilización de liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en células huésped adecuadas. En particular, las composiciones de la presente invención pueden formularse para la administración encapsuladas en una partícula lipídica, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similar. La formulación y utilización de tales vehículos de administración pueden llevarse a cabo utilizando técnicas conocidas y convencionales.
- Los polímeros hidrofílicos adecuados para la utilización en la presente invención son aquellos que son fácilmente solubles en agua, pueden unirse covalentemente a un lípido formador de vesícula, y que resultan tolerados *in vivo* sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Entre los polímeros adecuados se incluyen polietilenglicol (PEG),

poliláctico (también denominado poliláctido), ácido poliglicólico (también denominado poliglicólido), un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico y alcohol polivinílico. En determinadas realizaciones, los polímeros presentan un peso molecular de entre aproximadamente 100 o 120 daltons, hasta aproximadamente 5.000 o 10.000 daltons, o de entre aproximadamente 300 daltons y aproximadamente 5.000 daltons. En otras realizaciones, el polímero es 5 polietilenglicol con un peso molecular de entre aproximadamente 100 y aproximadamente 5.000 daltons, o con un peso molecular de entre aproximadamente 300 y aproximadamente 5.000 daltons. En determinadas realizaciones, el polímero es polietilenglicol de 750 daltons (PEG(750)). Los polímeros también pueden definirse por el número de monómeros en los mismos; una realización preferente de la presente invención utiliza polímeros de por lo menos 10 aproximadamente tres monómeros, tales como los polímeros PEG que consisten en tres monómeros (aproximadamente 150 daltons).

Entre otros polímeros hidrofílicos que pueden resultar adecuados para la utilización en la presente invención se incluyen polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida, 15 polidimetilacrilamida y celulosas derivatizadas, tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

En determinadas realizaciones, una formulación de la presente invención comprende un polímero biocompatible 20 seleccionado del grupo que consiste en poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, polímeros de polivinilo, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas, polirpopileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poli(ácido bético), poli(ácido valérico), poli(láctido-co-caprolactona), polisacáridos, proteínas, ácidos polihialurónicos, policianoacrilatos y combinaciones, mezclas o copolímeros de los mismos.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que consisten en 6, 7 o 8 unidades de glucosa, designadas mediante 25 las letras griegas α , β o γ , respectivamente. Las unidades de glucosa se unen mediante enlaces α -1,4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación de silla de las unidades sacáridas, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) se sitúan en un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 se sitúan en el otro lado. En consecuencia, las caras externas son hidrofílicas, con lo que las ciclodextrinas son solubles en agua. 30 En contraste, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrofóbicas, ya que están revestidas por el hidrógeno de los átomos C-3 y C-5 y por oxígenos de tipo éter. Estas matrices permiten el acomplejamiento con una diversidad de compuestos relativamente hidrofóbicos, incluyendo, por ejemplo, compuestos esteroideos, tales como 17 α -estradiol (ver, p.ej., van Uden et al., Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113, 1994). El acomplejamiento tiene lugar mediante interacciones de van der Waals y mediante formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de las ciclodextrinas, ver Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822, 1994.

35 Las propiedades físicoquímicas de los derivados de ciclodextrina dependen fuertemente del tipo y grado de sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua va de insoluble (p.ej., triacetil-beta-ciclodextrina) a 147% soluble (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos solventes orgánicos. Las propiedades de las ciclodextrinas permiten el control de la solubilidad de diversos componentes de la formulación mediante el incremento o reducción de su solubilidad.

40 Se han descrito numerosas ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I) et al., patente US nº 3.453.259 y Gramera et al., patente US nº 3.459.731, describen ciclodextrinas electroneutras. Entre otros derivados se incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), patente US nº 3.453.257], ciclodextrinas entrecruzadas insolubles (Solms, patente US nº 3.420.788) y ciclodextrinas con propiedades aniónicas 45 [Parmeter (III), patente US nº 3.426.011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, los ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiosulfónicos, ácidos tiosulfínicos y ácidos sulfónicos se han adjuntan a la ciclodextrina parental [ver Parmeter (III), supra]. Además, derivados de sulfoalquil-éter ciclodextrina han sido descritos por Stella et al. (patente US nº 5.134.127).

50 Los liposomas consisten en por lo menos una membrana de bicapa lipídica que circunda un compartimiento interno acuoso. Los liposomas pueden caracterizarse por el tipo de membrana y por el tamaño. Las vesículas unilamelares pequeñas (VUP) presentan una única membrana y típicamente presenta un diámetro de entre 0,02 y 0,05 μm ; las vesículas unilamelares grandes (VUG) típicamente son mayores de 0,05 μm . Las vesículas grandes oligolamelares y las vesículas multilamelares presentan múltiples capas de membrana, habitualmente concéntricas, y típicamente presentan un tamaño superior a 0,1 μm . Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas más pequeñas contenidas dentro de una vesícula mayor, se denominan vesículas multivesiculares.

60 Un aspecto de la presente invención se refiere a formulaciones que comprenden liposomas que contienen un oligómero de la presente invención, donde la membrana del liposoma se formula para proporcionar un liposoma con capacidad de carga incrementada. Alternativa o adicionalmente, el compuesto de la presente invención puede encontrarse contenido dentro, o adsorbido sobre, la bicapa lipídica del liposoma. Un oligómero de la presente invención puede agregarse con un surfactante lipídico y transportarse dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma se formula para resistir los efectos disruptivos del agregado de agente activo-surfactante.

65 Según una realización de la presente invención, la bicapa lipídica de un liposoma contiene lípidos derivatizados con

polietenglicol (PEG), de manera que la cadena de PEG se extiende desde la superficie interior de la bicapa lipídica hacia el interior del espacio interno encapsulado por el liposoma, y se extiende desde el exterior de la bicapa lipídica hasta el interior del medio circundante.

- 5 Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente invención se encuentran en forma solubilizada. Pueden atraparse agregados de surfactante y agente activo (tal como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) dentro del espacio interior de los liposomas según la presente invención. Un surfactante actúa dispersando y solubilizando el agente activo y puede seleccionarse de cualquier surfactante alifático, cicloalifático o aromático adecuado, incluyendo, aunque sin limitación, lisofosfatidilcolinas (LFC) 10 biocompatibles de longitudes de cadena variables (por ejemplo, de aproximadamente C14 a aproximadamente C20). Los lípidos derivatizados con polímero, tales como los PEG-lípidos, también pueden utilizarse para la formación de micelas, ya que actúan inhibiendo la fusión de micela/membrana y la adición de un polímero a moléculas de surfactante reduce la CMC del surfactante y ayuda en la formación de micelas. Resultan preferentes los surfactantes 15 con CMC en el rango micromolar; los surfactantes de CMC más elevada pueden utilizarse para preparar micelas atrapadas dentro de liposomas de la presente invención.

Los liposomas según la presente invención pueden prepararse mediante cualquiera de una diversidad de técnicas que son conocidas en la técnica. Ver, p.ej., la patente US nº 4.235.871, solicitudes publicadas de patente PCT nº WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33 a 104; Lasic DD,

- 20 20 Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Por ejemplo, pueden prepararse liposomas de la presente invención mediante la difusión de un lípido derivatizado con un polímero hidrofílico en liposomas preformados, tal como mediante la exposición de liposomas preformados a micelas compuestas de polímeros injertados con lípido, a concentraciones de lípido correspondientes al porcentaje molar final de lípido derivatizado que se desea en el liposoma. Los liposomas que contienen un polímero hidrofílico 25 también pueden formarse mediante técnicas de homogeneización, hidratación de campo lipídico o extrusión, tales como las conocidas en la técnica.

En otro procedimiento de formulación ejemplar, el agente activo en primer lugar se dispersa mediante sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro surfactante de CMC baja (incluyendo lípidos injertados con polímero) que solubiliza 30 fácilmente las moléculas hidrofóbicas. La suspensión micelar resultante del agente activo seguidamente se utiliza para rehidratar una muestra lipídica seca que contiene un porcentaje molar adecuado de lípido injertado con polímero, o colesterol. La suspensión de lípido y agente activo seguidamente se forma en liposomas utilizando técnicas de extrusión tales como las conocidas en la técnica y los liposomas resultantes se separan de la solución 35 no encapsulada mediante separación en columna estándar.

- 35 35 En un aspecto de la presente invención, los liposomas se preparan para que presenten tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaños seleccionado. Un método de dimensionado eficaz implica extrusionar una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que presentan un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana se corresponderá aproximadamente con 40 los tamaños más grandes de liposoma producidos por la extrusión a través de esa membrana. Ver, p.ej., la patente US nº 4.737.323 (12 de abril de 1988). En determinadas realizaciones, pueden utilizarse reactivos tales como DharmaFECT® y Lipofectamine® para introducir polinucleótidos o proteínas en las células.

- 45 45 Las características de liberación de una formulación de la presente invención dependen del material de encapsulado, de la concentración del fármaco encapsulado y de la presencia de modificadores de liberación. Por ejemplo, la liberación puede manipularse para que sea dependiente del pH, por ejemplo utilizando un recubrimiento sensible al pH que libere únicamente a n pH bajo, tal como en el estómago, o a un pH más alto, tal como en el intestino. Puede utilizarse un recubrimiento entérico para evitar que se produzca la liberación hasta después del paso por el estómago. Pueden utilizarse múltiples recubrimientos o mezclas de cianamida encapsulada en diferentes materiales 50 para obtener una liberación inicial en el estómago, seguido de la liberación posterior en el intestino. La liberación también puede manipularse mediante inclusión de sales o agentes formadores de poro, que pueden incrementar la incorporación de agua o la liberación de fármaco mediante difusión a partir de la cápsula. También pueden utilizarse excipientes que modifican la solubilidad del fármaco para controlar la tasa de liberación. También pueden 55 incorporarse agentes que potencian 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 particulados) o pueden codisolverse en la fase de polímero dependiendo del compuesto. En la mayoría de casos, la cantidad debe ser de entre 0,1 y treinta por ciento (p/p de polímero). Entre los tipos de intensificador de degradación se 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 sódico, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de cinc e hidróxido 60 de cinc, y bases orgánicas, tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y surfactantes, tales como Tween® y Pluronic®. Se añaden como particulados agentes formadores de poro que añaden microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua, tales como sales inorgánicas y azúcares). El rango es típicamente de entre uno y treinta por ciento (p/p de polímero).

- 65 65 La incorporación también puede manipularse mediante la alteración del tiempo de residencia de las partículas en el tracto intestinal. Lo anterior puede conseguirse, por ejemplo, mediante recubrimiento de la partícula con un polímero

adhesivo mucosal o seleccionando como material de encapsulado un polímero adhesivo mucosal. Entre los ejemplos se incluyen la mayoría de polímeros con grupos carboxilo libres, tales como quitosano, celulosas y especialmente poliacrilatos (tal como se utiliza en la presente memoria, poliacrilato se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados, tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

Un oligómero puede formularse para encontrarse contenido o adaptado para la liberación por un dispositivo o implante quirúrgico o médico. En determinados aspectos, un implante puede recubrirse o tratarse de otro modo con un oligómero. Por ejemplo, pueden utilizarse hidrogeles, u otros polímeros, tales como polímeros biocompatibles y/o biodegradables, para recubrir un implante con las composiciones de la presente invención (es decir, la composición puede adaptarse para la utilización con un dispositivo médico mediante la utilización de un hidrogel u otro polímero). Los polímeros y copolímeros para el recubrimiento de dispositivos médicos con un agente son bien conocidos en la técnica. Entre los ejemplos de implantes se incluyen, aunque sin limitación, stents, stens de elución de fármaco, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéteres de diálisis, injertos vasculares, válvulas cardíacas prostéticas, marcapasos cardíacos, desfibriladores cardioversores implantables, agujas IV, dispositivos para la consolidación y formación ósea, tales como clavos, tornillos, placas y otros dispositivos, y matrices de tejido artificiales para la cicatrización de heridas.

Además de los métodos proporcionados en la presente memoria, pueden formularse los oligómeros utilizados según la invención para la administración de cualquier manera conveniente para la utilización en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros farmacéuticos. Los oligómeros antisentido y sus formulaciones correspondientes pueden administrarse solas o en combinación con otras estrategias terapéuticas en el tratamiento de la distrofia muscular, tal como el trasplante de mioblastos, las terapias con células madre, la administración de antibióticos aminoglucósidos, los inhibidores del proteasoma y las terapias de regulación positiva (p.ej., la regulación positiva de la utrofina, un parálogo autosómico de la distrofina).

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

REFERENCIAS

- Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." *Am. J. Hum. Genet.* 74(1): 83-92.
 Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." *Nucleosides & Nucleotides* 16(7-9): 1665-1668.
 Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." *Hum. Mol. Genet.* 7(7): 1083-90.
 Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." *J. Gene Med.* 5(6): 518-27.
 Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." *Mol. Ther.*
 Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." *Nat. Med.* 9(8): 1009-14.
 Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." *J. Gene Med.* 4(6): 644-54.
 Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.
 Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." *J. Clin. Invest.* 87(6): 2127-31.
 Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." *Genomics* 2(1): 90-5.
 Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226(2): 445-9.
 Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina
 Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(23): 12840-4.
 Summerton, J. y D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7(3): 187-95.
 Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." *J. Clin. Invest.* 95(2): 515-20.

- van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." *Hum. Mol. Genet.* 10(15): 1547-54.
- van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." *N. Engl. J. Med.* 357(26): 2677-86.
- 5 Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." *Mol. Ther.* 15(7): 1288-96.
- Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." *Neuromuscul. Disord.* 9(5): 330-8.
- 10 Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(39): 14814-9.
- Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." *Hum. Mol. Genet.* 17(24): 3909-18.

Ejemplos

- 15 **Materiales y métodos**
- Condiciones de tratamiento de cultivos celulares y tejidos
- 20 Las células de rabdomiosarcoma humanas (ATCC nº CCL-136; células RD) conservadas en una solución de DMSO al 5% (Sigma) a un número de pases bajo se descongelaron en un baño de agua a 37°C hasta que el hielo ya no era visible. Las células se sembraron en matraces T75 tratados para el cultivo de tejidos (Nunc) a razón de $1,5 \times 10^6$ células/matrás en 24 ml de DMEM caliente con L-glutamina (HyClone), suero de feto bovino al 10% y solución de antibióticos penicilina-estreptomicina al 1% (CelGro); tras 24 horas, se aspiró el medio, se lavaron las células una vez en PBS caliente y se añadió medio fresco. Las células se cultivaron hasta una confluencia del 80% en un incubador a 37°C con 5,0% de CO₂.
- 25 Se aspiró el medio de los matraces T75; se lavaron las células una vez en PBS caliente y se aspiraron. Se añadieron 3 ml de tripsina/EDTA, calentados en un baño de agua a 37°C, a cada T75. Las células se incubaron a 37°C durante 2 a 5 minutos, bajo agitación suave, hasta desenganchárlas del matraz. La suspensión celular se transfirió a un tubo cónico de 15,0 ml; los matraces se enjuagaron con 1,0 ml de solución de tripsina/EDTA para recolectar las células restantes. Las células se contaron con un contador celular Vi-Cell XR (Beckman Coulter). Las células se sembraron en placas de 12 pocillos tratadas para el cultivo de tejidos (Falcon) a razón de $2,0 \times 10^5$ células viables por pocillo en 1,0 ml de medio. Las células se incubaron durante la noche en un incubador a 37°C con 5,0% de CO₂.
- 30 Se examinaron las placas sembradas de 12 pocillos para una distribución celular y adherencia a la placa uniformes. Los oligómeros morfolino fosforodiamidato conjugados con péptido liofilizado (OMFF) se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Ambion) hasta 2,0 mM y se mantuvieron sobre hielo durante el tratamiento celular; para verificar la molaridad, los OMFF se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Inmediatamente antes del tratamiento con OMFF, se aspiró el medio y las células se enjuagaron en PBS caliente. Se diluyeron los OMFF en medio caliente hasta la molaridad deseada; las células se trataron en un total de 1,0 ml de OMFF por pocillo. Los OMFF se sometieron a ensayo por triplicado. Para los controles sin tratamiento, se añadió medio caliente en un volumen total de 1,0 ml. Las células se incubaron durante 48 horas en un incubador a 37°C con 5,0% de CO₂.
- 35 Se extrajeron las placas sembradas de 12 pocillos para una distribución celular y adherencia a la placa uniformes. Los oligómeros morfolino fosforodiamidato conjugados con péptido liofilizado (OMFF) se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Ambion) hasta 2,0 mM y se mantuvieron sobre hielo durante el tratamiento celular; para verificar la molaridad, los OMFF se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Inmediatamente antes del tratamiento con OMFF, se aspiró el medio y las células se enjuagaron en PBS caliente. Se diluyeron los OMFF en medio caliente hasta la molaridad deseada; las células se trataron en un total de 1,0 ml de OMFF por pocillo. Los OMFF se sometieron a ensayo por triplicado. Para los controles sin tratamiento, se añadió medio caliente en un volumen total de 1,0 ml. Las células se incubaron durante 48 horas en un incubador a 37°C con 5,0% de CO₂.
- 40 Se examinaron las placas sembradas de 12 pocillos para una distribución celular y adherencia a la placa uniformes. Los oligómeros morfolino fosforodiamidato conjugados con péptido liofilizado (OMFF) se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Ambion) hasta 2,0 mM y se mantuvieron sobre hielo durante el tratamiento celular; para verificar la molaridad, los OMFF se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Inmediatamente antes del tratamiento con OMFF, se aspiró el medio y las células se enjuagaron en PBS caliente. Se diluyeron los OMFF en medio caliente hasta la molaridad deseada; las células se trataron en un total de 1,0 ml de OMFF por pocillo. Los OMFF se sometieron a ensayo por triplicado. Para los controles sin tratamiento, se añadió medio caliente en un volumen total de 1,0 ml. Las células se incubaron durante 48 horas en un incubador a 37°C con 5,0% de CO₂.
- 45 Se examinaron las placas sembradas de 12 pocillos para una distribución celular y adherencia a la placa uniformes. Los oligómeros morfolino fosforodiamidato conjugados con péptido liofilizado (OMFF) se resuspendieron en agua libre de nucleasas (Ambion) hasta 2,0 mM y se mantuvieron sobre hielo durante el tratamiento celular; para verificar la molaridad, los OMFF se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Inmediatamente antes del tratamiento con OMFF, se aspiró el medio y las células se enjuagaron en PBS caliente. Se diluyeron los OMFF en medio caliente hasta la molaridad deseada; las células se trataron en un total de 1,0 ml de OMFF por pocillo. Los OMFF se sometieron a ensayo por triplicado. Para los controles sin tratamiento, se añadió medio caliente en un volumen total de 1,0 ml. Las células se incubaron durante 48 horas en un incubador a 37°C con 5,0% de CO₂.
- 50 **Extracción del ARN**
- Se aspiró el medio y las células se enjuagaron en PBS caliente. Se extrajo el ARN con el sistema QuickGene-Min80, el kit QuickGene RNA cultured clel HC kit S y MagNAlyser con homogeneización con microesferas cerámicas, siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante. Brevemente, las células se lisaron en placas de tratamiento con 350 µl de tampón de lisis LRP (10 µl de β-mercaptoetanol añadido por cada 100 µl de LRP); el homogenizado se trituró suavemente para garantizar la lisis completa y se transfirió a tubos MagNAlyser. Los tubos se centrifugaron a 2.800 rpm durante 30 segundos en el MagNAlyser para garantizar la homogeneización completa y se congelaron brevemente. Se añadieron 50 µl de tampón de solubilización SRP y el homogenizado se agitó con vórtex durante 15 segundos. Se añadieron 170 µl de etanol >99% a cada tubo y el homogenizado se agitó con vórtex durante 60 segundos. El homogenizado se sometió a centrifugación instantánea y se transfirió a cartuchos de ARN Mini80; las muestras se presurizaron y el eluido se descartó. Los cartuchos se lavaron en 750 µl de tampón de lavado WRP y se presurizaron. Se añadieron 40 µl de solución de ADNasa (1,25 µl de ADNasa I Qiagen, 35 µl de tampón RDD, 3,75 µl de agua libre de nucleasas) directamente a la membrana del cartucho; los cartuchos se incubaron durante cuatro minutos a temperatura ambiente. Los cartuchos se lavaron dos veces con 750 µl de WRP, presurizando después de cada lavado. Los cartuchos se colocaron sobre los tubos libres de nucleasas. Se añadieron 50 µl de tampón de elución CRP a cada membrana; las membranas se incubaron durante cinco minutos a temperatura ambiente. Se presurizaron los cartuchos y se recogió el eluido. Se almacenó el ARN a -80°C pendientes de la cuantificación. Se cuantificó el ARN utilizando el espectrofotómetro NanoDrop™ 2000.

ES 2 955 539 T3

RT-PCR anidada

Se llevó a cabo una amplificación por RT-PCR anidada optimizada específica de exón y específica de cebador, utilizando los conjuntos de parejas de cebadores para cada exón de distrofina, tal como se muestra a continuación, en la Tabla 1.

5 Tabla 1: conjuntos de parejas de cebadores utilizados para amplificar por PCR el ARNm de la distrofina humana para la detección de omisión exónica

Nombre	F/R	I/O	Secuencia (5'-3')	Exón	Objetivo	SEC ID nº
PS170	F	O	CCAGAGCTTACCTGAGAACAAAG	48	Detección de la omisión de los exones 50 y 51 en la distrofina humana	640
PS172	F	I	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	49		641
PS174	R	I	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	52		642
PS176	R	O	CATTCATTCAACTGTTGCCTCCG	53		643
PS186	F	O	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	42	Detección de la omisión de los exones 44 y 45 en la distrofina humana	644
PS187	F	I	GTCTACAACAAAGCTCAGGTGCG	43		645
PS189	F	I	GCAATGTTATCTGCTTCCTCAAACC	46		646
PS190	R	O	GCTCTTTCCAGGTTCAAGTGG	46		647
PS192	F	O	CTTGGACAGAACTTACCGACTGG	51	Detección de la omisión del exón 53 en la distrofina humana	648
PS193	F	I	GCAGGGATTGGAACAGAGGCG	52		649
PS195	R	I	CATCTACATTGTCTGCCACTGG	54		650
PS197	R	O	GTTCCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	55		651

10 Las parejas de cebadores indicadas se muestran como directas o inversas (F/R) y como parejas de cebadores externos o internos (I/O), correspondientes a amplificaciones primarias o secundarias, respectivamente. La localización de la diana cebador se indica en la columna Exón y el Objetivo indica los sucesos de omisión exónica que pueden detectarse. Por ejemplo, los cebadores PS170 y PS176 amplifican una región entre los exones 48 a 53 en la amplificación primaria. Los cebadores PS172 y PS174 seguidamente amplifican una región entre los exones 49 y 52 en la amplificación secundaria. Esta reacción de PCR anidada detecta la omisión exónica del exón 50 y/o el exón 51. Las condiciones de reacción de RT-PCR anidada específica se proporcionan a continuación.

15 El ARN extraído de las células tratadas (indicado a continuación) se diluyó a 20 ng/μl en todas las muestras.

20 Tabla 2: configuración de la reacción de RT-PCR y amplificación primaria (reacción de 50 μl):

Mezcla de reacción 2x	25 μl
Cebador directo PS XXX (30 μM) (ver la Tabla 1)	0,5 μl
Cebador inverso PS XXX (30 μM) (ver la Tabla 1)	0,5 μl
Mezcla Superscript III Platinum Taq	2 μl
ARN molde (20 ng/μl)	10 μl
Agua libre de nucleasas (volumen total: 50 μl)	12 μl

25 Tabla 3: RT-PCR y programa de amplificación primaria:

	Temperatura	Tiempo	
Transcripción inversa	55°C	30 minutos	
inactivación de RT	94°C	2 minutos	
Desnaturalización	94°C	1 minuto	8 ciclos
Hibridación	59°C	1 minuto	
Elongación	68°C	1 minuto	
	4°C	∞	

Tabla 4: configuración de la reacción para la amplificación secundaria anidada (reacción de 50 μl):

Tampón de PCR 10x	5 μl
Solución de dNTP (10 mM)	0,5 μl
MgCl 50 mM	1,5 μl
Cebador directo PS XXX (30 μM) (ver la Tabla 1)	0,33 μl
Cebador inverso PS XXX (30 μM) (ver la Tabla 1)	0,33 μl
ADN polimerasa Taq Platinum	0,2 μl
Cy5-dCTP 0,1 mM	1 μl
Producto de RT-PCR (de la Etapa 1)	1 μl
Agua libre de nucleasas (volumen total: 50 μl)	40,15 μl

Tabla 5: programa de amplificación secundaria anidada:

	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización primaria	94°C	3 minutos	28 a 30 ciclos
Desnaturalización	94°C	45 segundos	
Hibridación	59°C	30 segundos	
Elongación	68°C	1 minuto	
	4°C	∞	

5 Análisis de electroforesis en gel

Se añadieron diez microlitros de pigmento de carga Ficoll 5x a cada 50 microlitros de reacción de RT-PCR anidada. Se hicieron migrar quinco microlitros de mezcla de PCR/pigmento en un gel de TBE al 10% a 300 voltios durante 30 minutos. Tras la electroforesis, el gel se lavó en H₂Odi durante por lo menos una hora, cambiando el agua cada 30 minutos. A continuación, se escaneó el gel en un aparato Typhoon Trio Variable Mode Imager (GE Healthcare). Para la omisión del exón 44, el producto de RT-PCR anidado del transcripto de distrofina de longitud completa es de 571 pb y 423 pb del ARNm con omisión del exón 44 (el exón 44 es de 148 pb). Para la omisión del exón 45, el producto de RT-PCR anidado del transcripto de distrofina de longitud completa es de 571 pb y 395 pb del ARNm con omisión del exón 45 (el exón 45 es de 176 pb). Para la omisión del exón 53, el producto de PCR anidado del transcripto de distrofina de longitud completa es de 365 pb y 153 pb del ARNm con omisión del exón 53 (el exón 53 es de 212 pb).

Las imágenes del gel se sometieron a análisis cuantitativo mediante la medición de las intensidades de las bandas del producto de PCR de longitud completa en comparación con el producto con omisión exónica. En algunos casos, el porcentaje de omisión a una concentración de OMFF (p.ej., 3 micromolar) se utilizó para determinar la actividad relativa de una serie de OMFF para inducir la omisión exónica de un exón dado. En otras situaciones, se utilizó un rango de dosis de OMFF para tratar las células (p.ej., 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 y 10 micromolar) y se calculó una EC₅₀ basándose en el porcentaje de omisión inducido a cada concentración.

25 Ejemplo 1 (no parte de la presente invención)

Escaneo del exón 51

Se diseñó, sintetizó y utilizó una serie de OMFF antisentido solapantes con diana en el exón 51 de la distrofina humana para tratar células de rabdomiosarcoma (células RD) humanas o células de músculo esquelético humano primarias. Esta estrategia se denomina "escaneo de exones" y se utiliza de manera similar para varios otros exones de distrofina, tal como se indica a continuación. Se sintetizaron todos los OMFF como OMF (OMFF) conjugado con péptido utilizando el péptido CP06062 (SEC ID nº 578) y un enlace de OMF 3'-terminal. Para el exón 51, se preparó una serie de 26 OMFF, cada uno de 26 bases de longitud (SEC ID nº 309 a 311, 314, 316, 317, 319, 321, 323, 324, 326, 327, 329 a 331, 333, 335, 336, 338 a 345) tal como se muestran en la figura 2A. Se evaluaron los OMFF para la eficacia de omisión exónica mediante el tratamiento de células RD a diversas concentraciones, tal como se ha indicado anteriormente en la sección de Materiales y métodos. Se identificaron tres OMFF (SEC ID nº 324, 326 y 327) como eficaces en la inducción de omisión exónica y se seleccionaron para evaluación adicional. Se utilizaron experimentos de rangos de dosis en células RD y células de músculo esquelético humano primarias para confirmar la eficacia relativa de estas tres secuencias de OMFF. Se demostró que la SEC ID nº 327 era la más eficaz en la inducción de la omisión del exón 51, tal como se muestra en las figuras 2B y 2C.

Se llevó a cabo una identificación de la eficacia relativa de la SEC ID nº 327 respecto a otras secuencias antisentido con diana en el exón 51 realizada en las células RD y células de músculo esquelético humano primarias, tal como se ha indicado anteriormente. Todas las secuencias evaluadas se generaron como OMF conjugadas con péptido utilizando el péptido CP06062 (SEC ID nº 578). Lo anterior permitió una comparación directa de la eficacia directa de las secuencias antisentido con independencia de la configuración química antisentido o la administración celular. La localización relativa de determinados oligos con diana en el exón 51 comparada con la SEC ID nº 327 se muestra en la figura 2D. Tal como se muestra en la figura 2C, existe una jerarquía ordenada de eficacia de omisión exónica, siendo la SEC ID nº 327 la más eficaz como mínimo en un factor de varias veces en comparación con otras secuencias.

50 Ejemplo 2

Escaneo del exón 50

55 Se diseñó una serie de OMFF antisentido solapantes que presentaban como diana el exón 50 de la distrofina humana y se sintetizaron. Para el exón 50, se preparó una serie de 17 OMFF, cada uno de 25 bases de longitud (SEC ID nº 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 280, 282 y 284 a 291), tal como se muestra en la figura 3A. Se evaluaron los OMFF para la eficacia de omisión exónica mediante el tratamiento de células RD a diversas

concentraciones, tal como se ha indicado anteriormente en la sección de Materiales y métodos. Se identificaron cuatro OMFF (SEC ID nº 277, 287, 290 y 291) como eficaces en la inducción de omisión exónica y se seleccionaron para evaluación adicional. Se utilizaron experimentos de determinación de dosis en células RD para confirmar la eficacia relativa de estas cuatro secuencias de OMF. Se demostró que las SEC ID nº 584 (AVI-5656) y 287 (AVI-5038) eran las más eficaces en la inducción de la omisión del exón 50, tal como se muestra en la fig. 3B. Se derivaron valores de ECD50 a partir de los experimentos de determinación de dosis y representan la concentración calculada, en la que el 50% del producto de PCR era de ARN sin exón 50 respecto al producto de PCR producido a partir de ARNm que contenía el exón 50. En comparación con otras secuencias (ver, p.ej., las SEC ID nº 584 y 585, correspondientes a las SEC ID nº 173 y 175 en el documento nº WO2006/000057, respectivamente), AVI-5038 (SEC ID nº 287) es equivalente o mejor en la inducción de la actividad de omisión exónica en el ensayo de células RD, tal como se muestra en la figura 3B.

Ejemplo 3 (no parte de la presente invención)

15 Escaneo del exón 53

Se diseñó una serie de OMFF antisentido solapantes que presentaban como diana el exón 53 de la distrofina humana y se sintetizaron. Para el exón 53, se generó una serie de 24 OMFF, cada uno de 25 bases de longitud (SEC ID nº 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 429, 431, 433, 434, 436, 438 a 440 y 443 a 451), tal como se muestra en la figura 4A. Se evaluaron los OMFF para eficacia de omisión exónica mediante el tratamiento de las células RD y células de músculo esquelético humano primarias a diversas concentraciones, tal como se ha indicado anteriormente en la sección de Materiales y métodos. Se identificaron tres OMFF (SEC ID nº 428, 429 y 431) como eficaces en la inducción de omisión exónica y se seleccionaron para evaluación adicional. Se utilizaron experimentos de determinación de dosis en células RD para confirmar la eficacia relativa de estas tres secuencias de OMF. Se demostró que la SEC ID nº 429 era la más eficaz en la inducción de la omisión del exón 53, tal como se muestra en las figuras 4B-F. Sin embargo, al realizar la comparación con otras secuencias antisentido del exón 53, SEC ID nº 429 demostró ser idéntica a H53A(+23+47), que se lista como SEC ID nº 195 en el documento nº WO2006/000057 y la SEC ID nº 609 en la presente solicitud. Se compararon otras secuencias con la SEC ID nº 429, incluyendo H53A(+39+69) y H53A(-12+10) (listados como SEC ID nº 193 y nº 199 en el documento nº WO2006/000057, respectivamente) y h53AON1 (listado como SEC ID nº 39 en la solicitud de patente US nº 11/233,507) y listados como SEC ID nº 608, 611 y 610, respectivamente, en la presente solicitud. Todas las secuencias evaluadas se generaron como OMF conjugadas con péptido utilizando el péptido CP06062 (SEC ID nº 578). Lo anterior permitió una comparación directa de la eficacia directa de las secuencias antisentido con independencia de la configuración química antisentido o la administración celular. Tal como se muestra en las figuras 4I y 4G-H, se demostró que la SEC ID nº 429 era superior a cada una de dichas cuatro secuencias.

Ejemplo 4 (no parte de la presente invención)

40 Escaneo del exón 44

Se diseñó una serie de OMFF antisentido solapantes que presentaban como diana el exón 44 de la distrofina humana y se sintetizaron. Para el exón 44, se generó una serie de OMFF, cada uno de 25 bases de longitud (SEC ID nº 1 a nº 20) tal como se muestra en la fig. 5A. Se evaluaron los OMFF para la eficacia de omisión exónica mediante el tratamiento de células RD a diversas concentraciones, tal como se ha indicado anteriormente en la sección de Materiales y métodos. Se identificaron cinco OMFF (SEC ID nº 4, 8, 11, 12 y 13) como eficaces en la inducción de omisión exónica y se seleccionaron para la evaluación adicional. Se utilizaron experimentos de determinación de dosis en células RD para confirmar la eficacia relativa de estas cinco secuencias de OMFF, tal como se muestra en las figuras 5C a 5H. Se demostró que las SEC ID nº 8, 11 y 12 eran las más eficaces en la inducción de la omisión del exón 44, tal como se muestra en la fig. 5H, demostrando ser la más eficaz la SEC ID nº 12.

Se llevaron a cabo comparaciones de la SEC ID nº 12 con otras secuencias antisentido del exón 44 tanto en células RD como en células de músculo esquelético humano primarias. Todas las secuencias evaluadas se generaron como OMF conjugadas con péptido utilizando el péptido CP06062 (SEC ID nº 578). Lo anterior permitió una comparación directa de la eficacia directa de las secuencias antisentido con independencia de la configuración química antisentido o la administración celular.

La alineación de las secuencias (SEC ID nº 600, 601, 602 y 603) con SEC ID nº 4, 8, 11 y 12 se muestra en la figura 5B. Las SEC ID nº 601 y 603 se listan como SEC ID nº 165 y 167 en el documento nº WO2006/000057. La SEC ID nº 602 se lista en el documento nº WO2004/083446 y como SEC ID nº 21 en la solicitud de patente US nº 11/233.507. La SEC ID nº 600 se publicó en 2007 (Wilton, Fall et al., 2007). La comparación en las células RD demostró que tanto la SEC ID nº 602 como la nº 603 eran superiores a la SEC ID nº 12 (fig. 5I). Sin embargo, tal como se muestra en la figura 5J, en células de músculo esquelético primarias humanas, la SEC ID nº 12 era superior (8,86% de omisión exónica) a la SEC ID nº 602 (6,42%). Se llevaron a cabo experimentos similares con la SEC ID nº 603.

Ejemplo 5 (no parte de la presente invención)

Escaneo del exón 45

- 5 Se diseñó una serie de OMFF antisentido solapantes que presentaban como diana el exón 45 de la distrofina humana y se sintetizaron. Para el exón 45, se preparó una serie de 22 OMFF, cada uno de 25 bases de longitud (SEC ID nº 21, 23, 25, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43 y 45 a 53), tal como se muestra en la figura 6A. Se evaluaron los OMFF para eficacia de omisión exónica mediante el tratamiento de las células RD y células de músculo esquelético humano primarias a diversas concentraciones, tal como se ha indicado anteriormente en la sección de Materiales y métodos. Se identificaron cinco OMFF (SEC ID nº 27, 29, 34 y 39) como eficaces en la inducción de omisión exónica y se seleccionaron para la evaluación adicional. Se utilizaron experimentos de determinación de dosis en células RD para confirmar la eficacia relativa de estas cuatro secuencias de OMFF, tal como se muestra en las figuras 6C-G y se resume en la figura 6H. Se utilizó la SEC ID nº 49 como control negativo en estos experimentos. Se demostró que las SEC ID nº 29 y 34 era la más eficaz en la inducción de la omisión del exón 45, tal como se muestra en la fig. 6H.

20 Se llevaron a cabo una comparación de la SEC ID nº 34 con otras secuencias antisentido del exón 45 tanto en células RD como en células de músculo esquelético humano primarias. Todas las secuencias evaluadas se generaron como OMF conjugadas con péptido utilizando el péptido CP06062 (SEC ID nº 578). Lo anterior permitió una comparación directa de la eficacia directa de las secuencias antisentido con independencia de la configuración química antisentido o la administración celular. La alineación de las secuencias (SEC ID nº 604, 605, 606 y 607) con SEC ID nº 27, 29, 34 y 39 se muestra en la figura 6B. Las SEC ID nº 604 y 607 se listan como SEC ID nº 211 y 207 en el documento nº WO2006/000057, respectivamente. Se listaron las SEC ID nº 605 y nº 606 en la solicitud de patente US nº 11/233.507 como SEC ID nº 23 y 1, respectivamente. La comparación en las células RD demostró que la SEC ID nº 34 era superior a la totalidad de las cuatro secuencias evaluadas, tal como se muestra en la figura 6I. El ensayo de estos compuestos en diferentes poblaciones de células primarias de músculo esquelético humano se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente.

LISTADO DE ID DE SECUENCIA

30 Se muestran las secuencias utilizando los símbolos de base nucleótido comunes para el ADN: A, G, C y T. Otras químicas de las moléculas antisentido, tales como 2'-O-metilo utilizan U en lugar de T. Cualquiera de las bases puede sustituirse por inosina (I), especialmente en tramos de tres o más residuos de G. Las secuencias que son parte de la presente invención son como se definen en las revindicaciones.

Nombre	Secuencias	SEC ID nº
Secuencias con diana en oligómeros (5' a 3'):		
Hu.DMD.Exón44.25.001	CTGCAGGTAAAAGCATATGGATCAA	1
Hu.DMD.Exón44.25.002	ATGCCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	2
Hu.DMD.Exón44.25.003	GTCAAATGCCCTGCAGGTAAAAGCA	3
Hu.DMD.Exón44.25.004	GATCTGTCAAATGCCCTGCAGGTAA	4
Hu.DMD.Exón44.25.005	CAACAGATCTGTCAAATGCCCTGCA	5
Hu.DMD.Exón44.25.006	TTTCTCAACAGATCTGCAAATCGC	6
Hu.DMD.Exón44.25.007	CCATTTCTCAACAGATCTGCAAAT	7
Hu.DMD.Exón44.25.008	ATAATGAAAACGCCGCCATTCTCA	8
Hu.DMD.Exón44.25.009	AAATATCTTATATCATAATGAAAAA	9
Hu.DMD.Exón44.25.010	TGTTAGCCACTGATTAATATCTTT	10
Hu.DMD.Exón44.25.011	AAACTGTTCAAGCTTCTGTTAGCCAC	11
Hu.DMD.Exón44.25.012	TTGTGTCTTCTGAGAAACTGTTCA	12
Hu.DMD.Exón44.25.013	CCAATTCTCAGGAATTGTGTCTT	13
Hu.DMD.Exón44.25.014	GTATTTAGCATGTTCCAATTCTCA	14
Hu.DMD.Exón44.25.015	CTTAAGATACCATTGTATTAGCA	15
Hu.DMD.Exón44.25.016	CTTACCTTAAGATACCATTGTATT	16
Hu.DMD.Exón44.25.017	AAAGACTTACCTTAAGATACCATT	17
Hu.DMD.Exón44.25.018	AAATCAAAGACTTACCTTAAGATAC	18
Hu.DMD.Exón44.25.019	AAAACAATCAAAGACTTACCTTAA	19
Hu.DMD.Exón44.25.020	TCGAAAAAACAAATCAAAGACTTAC	20
Hu.DMD.Exón45.25.001	CTGTAAGATACCAAAAGGCAAAAC	21
Hu.DMD.Exón45.25.002	CCTGTAAGATACCAAAAGGCAAAAC	22
Hu.DMD.Exón45.25.002.2	AGTTCCCTGTAAGATACCAAAAGGC	23
Hu.DMD.Exón45.25.003	GAGTTCCCTGTAAGATACCAAAAGG	24
Hu.DMD.Exón45.25.003.2	CCTGGAGTTCCCTGTAAGATACCAA	25
Hu.DMD.Exón45.25.004	TCCTGGAGTTCCCTGTAAGATACCAA	26

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón45.25.004.2	GCCATCCTGGAGTCCTGTAAGATA	27
Hu.DMD.Exón45.25.005	TGCCATCCTGGAGTCCTGTAAGAT	28
Hu.DMD.Exón45.25.005.2	CCAATGCCATCCTGGAGTCCTGTA	29
Hu.DMD.Exón45.25.006	CCCAATGCCATCCTGGAGTCCTGTT	30
Hu.DMD.Exón45.25.006.2	GCTGCCAATGCCATCCTGGAGTTC	31
Hu.DMD.Exón45.25.007	CGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTT	32
Hu.DMD.Exón45.25.008	AACAGTTGCCGCTGCCAATGCCA	33
Hu.DMD.Exón45.25.008.2	CTGACAACAGTTGCCGCTGCCCAA	34
Hu.DMD.Exón45.25.009	GTTGCATTCAATGTTCTGACAACAG	35
Hu.DMD.Exón45.25.010	GCTGAATTATTTCTCCCCAGTTGC	36
Hu.DMD.Exón45.25.010.2	ATTATTTCTCCCCAGTTGCATTCA	37
Hu.DMD.Exón45.25.011	GGCATCTGTTTGAGGATTGCTGA	38
Hu.DMD.Exón45.25.011.2	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTT	39
Hu.DMD.Exón45.25.012	AATTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	40
Hu.DMD.Exón45.25.012.2	ATACTGGCATCTGTTTGAGGATT	41
Hu.DMD.Exón45.25.013	ACCGCAGATTCAAGCTCCCAATT	42
Hu.DMD.Exón45.25.013.2	AATTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	43
Hu.DMD.Exón45.25.014	CTGTTGCAGACCTCCTGCCACCGC	44
Hu.DMD.Exón45.25.014.2	AGATTCAAGCTCCCAATTTCCT	45
Hu.DMD.Exón45.25.015	CTCTTTTCTGTCAGAGCTGTT	46
Hu.DMD.Exón45.25.015.2	ACCTCCTGCCACCGCAGATTCAAGC	47
Hu.DMD.Exón45.25.016	CCTACCTTTTCTGTCAGAG	48
Hu.DMD.Exón45.25.016.2	GACAGCTGTTGCAGACCTCCTGCC	49
Hu.DMD.Exón45.25.017	GTCGCCCTACCTCTTTTCTGTC	50
Hu.DMD.Exón45.25.018	GATCTGCGCCCTACCTCTTTTTC	51
Hu.DMD.Exón45.25.019	TATTAGATCTGTCGCCCTACCTCTT	52
Hu.DMD.Exón45.25.020	ATT CCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	53
Hu.DMD.Exón45.20.001	AGATACCAAAAGGCAAAAC	54
Hu.DMD.Exón45.20.002	AAGATACCAAAAGGCAAAA	55
Hu.DMD.Exón45.20.003	CCTGTAAGATACCAAAAGG	56
Hu.DMD.Exón45.20.004	GAGTCCTGTAAGATACCAA	57
Hu.DMD.Exón45.20.005	TCCTGGAGTCCTGTAAGAT	58
Hu.DMD.Exón45.20.006	TGCCATCCTGGAGTCCTGTT	59
Hu.DMD.Exón45.20.007	CCCAATGCCATCCTGGAGTT	60
Hu.DMD.Exón45.20.008	CGCTGCCCAATGCCATCCTG	61
Hu.DMD.Exón45.20.009	CTGACAACAGTTGCCGCTG	62
Hu.DMD.Exón45.20.010	GTTGCATTCAATGTTCTGAC	63
Hu.DMD.Exón45.20.011	ATTATTTCTCCCCAGTTGC	64
Hu.DMD.Exón45.20.012	TTTGAGGATTGCTGAATTAT	65
Hu.DMD.Exón45.20.013	ATACTGGCATCTGTTTGA	66
Hu.DMD.Exón45.20.014	AATTTTCCTGTAGAATACT	67
Hu.DMD.Exón45.20.015	AGATTCAAGCTCCCAATT	68
Hu.DMD.Exón45.20.016	ACCTCCTGCCACCGCAGATT	69
Hu.DMD.Exón45.20.017	GACAGCTGTTGCAGACCTC	70
Hu.DMD.Exón45.20.018	CTCTTTTCTGTCAGAG	71
Hu.DMD.Exón45.20.019	CCTACCTTTTCTGTC	72
Hu.DMD.Exón45.20.020	GTCGCCCTACCTCTTTTTC	73
Hu.DMD.Exón45.20.021	GATCTGCGCCCTACCTCTT	74
Hu.DMD.Exón45.20.022	TATTAGATCTGTCGCCCTAC	75
Hu.DMD.Exón45.20.023	ATT CCTATTAGATCTGTCGC	76
Hu.DMD.Exón46.25.001	GGGGGATTGAGAAAATAAATTAC	77
Hu.DMD.Exón46.25.002	ATT TGAGAAAATAAATTACCTTGA	78
Hu.DMD.Exón46.25.002.2	CTAGCCTGGAGAAAGAAGAAAA	79
Hu.DMD.Exón46.25.003	AGAAAATAAATTACCTTGACTTGC	80
Hu.DMD.Exón46.25.003.2	TTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	81
Hu.DMD.Exón46.25.004	ATAAAATTACCTTGACTTGCCTAAG	82
Hu.DMD.Exón46.25.004.2	TTTGTTCTCTAGCCTGGAGAAAG	83
Hu.DMD.Exón46.25.005	ATTACCTGACTTGCCTAAGCTTT	84
Hu.DMD.Exón46.25.005.2	TATTCTTTGTTCTCTAGCCTGGA	85
Hu.DMD.Exón46.25.006	CTTGACTTGCTCAAGCTTTCTTT	86
Hu.DMD.Exón46.25.006.2	CAAGATAATTCTTGTCTTAGC	87
Hu.DMD.Exón46.25.007	CTTTAGTTGCTGCTCTTCCAGG	88
Hu.DMD.Exón46.25.008	CCAGGTCAAGTGGATACTAGCAA	89

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón46.25.008.2	ATCTCTTGAAATTCTGACAAGATA	90
Hu.DMD.Exón46.25.009	AGCAATGTTATCTGCTTCCTCCAAC	91
Hu.DMD.Exón46.25.009.2	AACAAATTCAATTAAATCTCTTGA	92
Hu.DMD.Exón46.25.010	CCAACCATAAAACAAATTCAATTCA	93
Hu.DMD.Exón46.25.010.2	TTCCTCCAACCATAAAACAAATTCA	94
Hu.DMD.Exón46.25.011	TTTAATCTCTTGAAATTCTGACA	95
Hu.DMD.Exón46.25.012	TGACAAGATATTCTTGTTCCT	96
Hu.DMD.Exón46.25.012.2	TTCAAGTGGGATACTAGCAATGTTA	97
Hu.DMD.Exón46.25.013	AGATATTCTTTGTCTTAGCCT	98
Hu.DMD.Exón46.25.013.2	CTGCTCTTCCAGGTTCAAGTGGG	99
Hu.DMD.Exón46.25.014	TTCTTTGTTCTCTAGCCTGGAGA	100
Hu.DMD.Exón46.25.014.2	CTTTCTTTAGTTGCTGCTCTT	101
Hu.DMD.Exón46.25.015	TTGTTCTCTAGCCTGGAGAAAGAA	102
Hu.DMD.Exón46.25.016	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAATA	103
Hu.DMD.Exón46.25.017	AGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAATT	104
Hu.DMD.Exón46.25.018	CTGGAGAAAGAAGAATAAAATTGTT	105
Hu.DMD.Exón46.20.001	GAAAGAAGAATAAAATTGTT	106
Hu.DMD.Exón46.20.002	GGAGAAAGAAGAATAAAATT	107
Hu.DMD.Exón46.20.003	AGCCTGGAGAAAGAAGAATA	108
Hu.DMD.Exón46.20.004	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	109
Hu.DMD.Exón46.20.005	TTGTTCTCTAGCCTGGAGA	110
Hu.DMD.Exón46.20.006	TTCTTTGTTCTCTAGCCT	111
Hu.DMD.Exón46.20.007	TGACAAGATATTCTTTGTT	112
Hu.DMD.Exón46.20.008	ATCTCTTGAAATTCTGACA	113
Hu.DMD.Exón46.20.009	AACAAATTCAATTAAATCTC	114
Hu.DMD.Exón46.20.010	TTCCTCCAACCATAAAACAA	115
Hu.DMD.Exón46.20.011	AGCAATGTTATCTGCTTCCT	116
Hu.DMD.Exón46.20.012	TTCAAGTGGGATACTAGCAA	117
Hu.DMD.Exón46.20.013	CTGCTCTTCCAGGTTCAA	118
Hu.DMD.Exón46.20.014	CTTTCTTTAGTTGCTGCT	119
Hu.DMD.Exón46.20.015	CTTGACTTGCTCAAGCTTT	120
Hu.DMD.Exón46.20.016	ATTACCTTGACTTGCTCAAG	121
Hu.DMD.Exón46.20.017	ATAAAATTACCTTGACTTGC	122
Hu.DMD.Exón46.20.018	AGAAAATAAAATTACCTTGA	123
Hu.DMD.Exón46.20.019	ATTTGAGAAAATAAAATTAC	124
Hu.DMD.Exón46.20.020	GGGGGATTGAGAAAATAAA	125
Hu.DMD.Exón47.25.001	CTGAAACAGACAAATGCAACACGT	126
Hu.DMD.Exón47.25.002	AGTAACTGAAACAGACAAATGCAAC	127
Hu.DMD.Exón47.25.003	CCACCACTGAAACAGACAAAT	128
Hu.DMD.Exón47.25.004	CTCTTCCACCGAGTAACGTGAAACAGA	129
Hu.DMD.Exón47.25.005	GGCAACTCTCACCGAGTAACGTGAA	130
Hu.DMD.Exón47.25.006	GCAGGGGCAACTCTCACCGAGTAA	131
Hu.DMD.Exón47.25.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTTCCACC	132
Hu.DMD.Exón47.25.008	TTTAATTGTTGAGAATTCCCTGGC	133
Hu.DMD.Exón47.25.008.2	TTGTTGAGAATTCCCTGGCGCAGG	134
Hu.DMD.Exón47.25.009	GCACGGGTCCCTCAGTTCAATTAA	135
Hu.DMD.Exón47.25.009.2	TCCAGTTCAATTAAATTGTTGAGA	136
Hu.DMD.Exón47.25.010	GCTTATGGGAGCACTTACAAGCACG	137
Hu.DMD.Exón47.25.010.2	TACAAGCACGGGTCCCTCAGTTCA	138
Hu.DMD.Exón47.25.011	AGTTTATCTGCTCTCTGGCTTA	139
Hu.DMD.Exón47.25.012	TCTGCTTGAGCTTATTTCAGTTT	140
Hu.DMD.Exón47.25.012.2	ATCTTGCTCTCTGGGCTTATGGGA	141
Hu.DMD.Exón47.25.013	CTTTATCCACTGGAGATTGTCTGC	142
Hu.DMD.Exón47.25.013.2	CTTATTTCAAGTTTATCTGCTCT	143
Hu.DMD.Exón47.25.014	CTAACCTTATCCACTGGAGATTG	144
Hu.DMD.Exón47.25.014.2	ATTGTCTGCTTGAGCTTATTTCA	145
Hu.DMD.Exón47.25.015	AATGTCTAACCTTATCCACTGGAG	146
Hu.DMD.Exón47.25.016	TGGTTAATGTCTAACCTTATCCAC	147
Hu.DMD.Exón47.25.017	AGAGATGGTTAATGTCTAACCTTA	148
Hu.DMD.Exón47.25.018	ACGGAAGAGATGGTTAATGTCTAAC	149
Hu.DMD.Exón47.20.001	ACAGACAAATGCAACACGT	150
Hu.DMD.Exón47.20.002	CTGAAACAGACAAATGCAAC	151
Hu.DMD.Exón47.20.003	AGTAACTGAAACAGACAAAT	152

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón47.20.004	CCACCACTGAAACAGA	153
Hu.DMD.Exón47.20.005	CTCTTCCACCAGTAAGTGA	154
Hu.DMD.Exón47.20.006	GGCAACTCTTCCACCAGTAA	155
Hu.DMD.Exón47.20.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTT	156
Hu.DMD.Exón47.20.008	TTGTTTGAGAATTCCCTGGC	157
Hu.DMD.Exón47.20.009	TCCAGTTCATTTAATTGTT	158
Hu.DMD.Exón47.20.010	TACAAGCACGGGTCTCCAG	159
Hu.DMD.Exón47.20.011	GCTTATGGGAGCACTTACAA	160
Hu.DMD.Exón47.20.012	ATCTTGCTCTCTGGGCTTA	161
Hu.DMD.Exón47.20.013	CTTATTTCAAGTTATCTT	162
Hu.DMD.Exón47.20.014	ATTGTCTGCTTGAGCTTAT	163
Hu.DMD.Exón47.20.015	CTTTATCCACTGGAGATTTG	164
Hu.DMD.Exón47.20.016	CTAACCTTATCCACTGGAG	165
Hu.DMD.Exón47.20.017	AATGTCTAACCTTATCCAC	166
Hu.DMD.Exón47.20.018	TGGTTAATGTCTAACCTTA	167
Hu.DMD.Exón47.20.019	AGAGATGGTTAATGTCTAAC	168
Hu.DMD.Exón47.20.020	ACGGAAGAGATGGTTAATGT	169
Hu.DMD.Exón48.25.001	CTGAAAGGAAAATACATTTAAAAA	170
Hu.DMD.Exón48.25.002	CCTGAAAGGAAAATACATTTAAAA	171
Hu.DMD.Exón48.25.002.2	GAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	172
Hu.DMD.Exón48.25.003	GGAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	173
Hu.DMD.Exón48.25.003.2	CTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATAC	174
Hu.DMD.Exón48.25.004	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATA	175
Hu.DMD.Exón48.25.004.2	TAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	634
Hu.DMD.Exón48.25.005	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGA	176
Hu.DMD.Exón48.25.005.2	TCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	177
Hu.DMD.Exón48.25.006	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGA	178
Hu.DMD.Exón48.25.006.2	GTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAAC	179
Hu.DMD.Exón48.25.007	TGTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	180
Hu.DMD.Exón48.25.007.2	AATTTCTCTTGTCTCAGGTAAA	181
Hu.DMD.Exón48.25.008	TTTGAGCTCAATTCTCCTTGT	182
Hu.DMD.Exón48.25.008	TTTTATTGAGCTTCATTCTCCT	183
Hu.DMD.Exón48.25.009	AAGCTGCCAAGGTCTTTATTTGA	184
Hu.DMD.Exón48.25.010	AGGTCTCAAGCTTTTTCAAGCT	185
Hu.DMD.Exón48.25.010.2	TTCAAGCTTTTTCAAGCTGCCA	186
Hu.DMD.Exón48.25.011	GATGATTAAC TGCTCTCAAGGTC	187
Hu.DMD.Exón48.25.011.2	CTGCTCTCAAGGTCTTCAGCTT	188
Hu.DMD.Exón48.25.012	AGGAGATAACCACAGCAGCAGATGA	189
Hu.DMD.Exón48.25.012.2	CAGCAGATGATTTAAC TGCTCTTC	190
Hu.DMD.Exón48.25.013	ATTTCCAAC TGATTCCTAATAGGAG	191
Hu.DMD.Exón48.25.014	CTTGGTTGGTTGGTTATAAATTC	192
Hu.DMD.Exón48.25.014.2	CAACTGATTCCTAATAGGAGATAAC	193
Hu.DMD.Exón48.25.015	CTTAACGTCAAATGGCTCTTCTGG	194
Hu.DMD.Exón48.25.015.2	TTGGTTATAAATTCCTAACGTCAAATGG	195
Hu.DMD.Exón48.25.016	CCTACCTAACGTCAAATGGCTCTT	196
Hu.DMD.Exón48.25.016.2	TCCTTCTGGTTGGTTGGTTATAA	197
Hu.DMD.Exón48.25.017	AGTCCCTACCTAACGTCAAATGG	198
Hu.DMD.Exón48.25.018	CAAAAAGTCCCTACCTAACGTCA	199
Hu.DMD.Exón48.25.019	TAAAGCAAAAAGTCCCTACCTAA	200
Hu.DMD.Exón48.25.020	ATATTTAAAGCAAAAAGTCCCTAC	201
Hu.DMD.Exón48.20.001	AGGAAAATACATTTAAAAA	202
Hu.DMD.Exón48.20.002	AAGGAAAATACATTTAAAAA	203
Hu.DMD.Exón48.20.003	CCTGAAAGGAAAATACATTT	204
Hu.DMD.Exón48.20.004	GGAAACCTGAAAGGAAAATA	205
Hu.DMD.Exón48.20.005	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	206
Hu.DMD.Exón48.20.006	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	207
Hu.DMD.Exón48.20.007	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	208
Hu.DMD.Exón48.20.008	AATTTCTCTTGTCTCAG	209
Hu.DMD.Exón48.20.009	TTTTATTGAGCTTCATT	210
Hu.DMD.Exón48.20.010	AAGCTGCCAAGGTCTTTA	211
Hu.DMD.Exón48.20.011	TTCAAGCTTTTTCAAGCT	212
Hu.DMD.Exón48.20.012	CTGCTCTCAAGGTCTTCAA	213
Hu.DMD.Exón48.20.013	CAGCAGATGATTTAAC TGCT	214

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón48.20.014	AGGAGATAACCACAGCAGCA	215	
Hu.DMD.Exón48.20.015	CAACTGATTCTAAATAGGAG	216	
Hu.DMD.Exón48.20.016	TTGGTTATAAAATTCCTTAACT	217	
Hu.DMD.Exón48.20.017	TCCTTCTGGTTGGTTGGT	218	
Hu.DMD.Exón48.20.018	CTTAACGTCAAATGGTCTT	219	
Hu.DMD.Exón48.20.019	CCTACCTAACGTCAAATGG	220	
Hu.DMD.Exón48.20.020	AGTTCCCTACCTAACGTCA	221	
Hu.DMD.Exón48.20.021	CAAAAAGTTCCCTACCTTAA	222	
Hu.DMD.Exón48.20.022	TAAAGCAAAAAGTCCCTAC	223	
Hu.DMD.Exón48.20.023	ATATTTAAAGCAAAAAGTTC	224	
Hu.DMD.Exón49.25.001	CTGGGGAAAAGAACCCATATAGTGC	225	
Hu.DMD.Exón49.25.002	TCCTGGGGAAAAGAACCCATATAGT	226	
Hu.DMD.Exón49.25.002.2	GTTTCCTGGGGAAAAGAACCCATAT	227	
Hu.DMD.Exón49.25.003	CAGTTCCCTGGGGAAAAGAACCCAT	228	
Hu.DMD.Exón49.25.003.2	TTTCAGTTCCCTGGGGAAAAGAAC	229	
Hu.DMD.Exón49.25.004	TATTTCAGTTCCCTGGGGAAAAGAA	230	
Hu.DMD.Exón49.25.004.2	TGCTATTCAGTTCCCTGGGGAAAAA	231	
Hu.DMD.Exón49.25.005	ACTGCTATTCAGTTCCCTGGGGAA	232	
Hu.DMD.Exón49.25.005.2	TGAAGTGTCTGGGGAAAAGAAC	233	
Hu.DMD.Exón49.25.006	CTTGAAGTGTCTGGGGAAAAGAAC	234	
Hu.DMD.Exón49.25.006.2	TAGCTTGAAGTGTCTGGGGAA	235	
Hu.DMD.Exón49.25.007	TTTAGCTTGAAGTGTCTGGGGAA	236	
Hu.DMD.Exón49.25.008	TTCCACATCCGGTTGTTAGCTTGA	237	
Hu.DMD.Exón49.25.009	TGCCCTTTAGACAAAATCTCTCCA	238	
Hu.DMD.Exón49.25.009.2	TTTAGACAAAATCTCTCCACATCC	239	
Hu.DMD.Exón49.25.010	GTTTTCCCTTGACAATGCTGCC	240	
Hu.DMD.Exón49.25.010.2	GTACAAATGCTGCCCTTAGACAAA	241	
Hu.DMD.Exón49.25.011	CTTCACTGGCTGAGTGGCTGGTTT	242	
Hu.DMD.Exón49.25.011.2	GGCTGGTTTCCCTGTACAATGC	243	
Hu.DMD.Exón49.25.012	ATTACCTTCACTGGCTGAGTGGCTG	244	
Hu.DMD.Exón49.25.013	GCTTCATTACCTTCACTGGCTGAGT	245	
Hu.DMD.Exón49.25.014	AGGTTGCTTCAATTACCTTCACTGGC	246	
Hu.DMD.Exón49.25.015	GCTAGAGGTTGCTTCAATTACCTCA	247	
Hu.DMD.Exón49.25.016	ATATTGCTAGAGGTTGCTTCAATTAC	248	
Hu.DMD.Exón49.20.001	GAAAAGAACCCATATAGTGC	249	
Hu.DMD.Exón49.20.002	GGGAAAAGAACCCATATAGT	250	
Hu.DMD.Exón49.20.003	TCCTGGGGAAAAGAACCCAT	251	
Hu.DMD.Exón49.20.004	CAGTTCCCTGGGGAAAAGAA	252	
Hu.DMD.Exón49.20.005	TATTTCAGTTCCCTGGGGAA	253	
Hu.DMD.Exón49.20.006	ACTGCTATTCAGTTCCCTG	254	
Hu.DMD.Exón49.20.007	CTTGAAGTGTCTGGGGAA	255	
Hu.DMD.Exón49.20.008	TTTAGCTTGAAGTGTCTATT	256	
Hu.DMD.Exón49.20.009	TTCCACATCCGGTTGTTAG	257	
Hu.DMD.Exón49.20.010	TTTAGACAAAATCTCTCCA	258	
Hu.DMD.Exón49.20.011	GTACAAATGCTGCCCTTAG	259	
Hu.DMD.Exón49.20.012	GGCTGG TTTTCCTGTACA	260	
Hu.DMD.Exón49.20.013	CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	261	
Hu.DMD.Exón49.20.014	ATTACCTTCACTGGCTGAGT	262	
Hu.DMD.Exón49.20.015	GCTTCATTACCTTCACTGGC	263	
Hu.DMD.Exón49.20.016	AGGTTGCTTCAATTACCTCA	264	
Hu.DMD.Exón49.20.017	GCTAGAGGTTGCTTCAATTAC	265	
Hu.DMD.Exón49.20.018	ATATTGCTAGAGGTTGCTTC	266	
Hu.DMD.Exón50.25.001	CTTTAACAGAAAAGCATACACATTA	267	
Hu.DMD.Exón50.25.002	TCCTCTTTAACAGAAAAGCATACAC	268	
Hu.DMD.Exón50.25.002.2	TTCCCTCTAACAGAAAAGCATACA	269	
Hu.DMD.Exón50.25.003	TAACTTCTCTTTAACAGAAAAGCA	270	
Hu.DMD.Exón50.25.003.2	CTAACCTCTCTTTAACAGAAAAGC	271	
Hu.DMD.Exón50.25.004	TCTTCTAACCTCTCTTTAACAGAA	272	
Hu.DMD.Exón50.25.004.2	ATCTTCTAACCTCTCTTTAACAGA	273	
Hu.DMD.Exón50.25.005	TCAGATCTTCTAACCTCTCTTTAA	274	
Hu.DMD.Exón50.25.005.2	CTCAGATCTTCTAACCTCTCTTTA	275	
Hu.DMD.Exón50.25.006	AGAGCTCAGATCTTCTAACCTCCT	276	
Hu.DMD.Exón50.25.006.2	NG-08-	CAGAGCTCAGATCTTCTAACCTCCT	277

0731		
Hu.DMD.Exón50.25.007	CACTCAGAGCTCAGATCTTCTACT	278
Hu.DMD.Exón50.25.007.2	CCTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTC	279
Hu.DMD.Exón50.25.008	GTAAACGGTTACCGCCTTCACTC	280
Hu.DMD.Exón50.25.009	CTTTGCCCTCAGCTCTGAAGTAAA	281
Hu.DMD.Exón50.25*009,2	CCCTCAGCTCTGAAGTAAACGGTT	282
Hu.DMD.Exón50.25.010	CCAGGAGCTAGGTAGGCTGCTTTG	283
Hu.DMD.Exón50.25.010.2	GGTCAGGCTGCTTGCCCTCAGCTC	284
Hu.DMD.Exón50.25.011	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTCCAGG	285
Hu.DMD.Exón50.25.011.2	TCAGTCCAGGAGCTAGGTAGGCTG	286
Hu.DMD.Exón50.25.012 AVI-5038	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	287
Hu.DMD.Exón50.25.013	GTATACTTACAGGCTCCAATAGTGG	288
Hu.DMD.Exón50.25.014	ATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	289
Hu.DMD.Exón50.25.015 NG-08-0741	ATGGGATCCAGTATACTTACAGGCT	290
Hu.DMD.Exón50.25.016 NG-08-0742	AGAGAATGGGATCCAGTATACTTAC	291
Hu.DMD.Exón50.20.001	ACAGAAAAGCATACACATTA	292
Hu.DMD.Exón50.20.002	TTAACAGAAAAGCATACAC	293
Hu.DMD.Exón50.20.003	TCCTCTTAAACAGAAAAGCA	294
Hu.DMD.Exón50.20.004	TAACCTCCTCTTAAACAGAA	295
Hu.DMD.Exón50.20.005	TCTTCTAACTTCCCTTTAA	296
Hu.DMD.Exón50.20.006	TCAGATCTCTAACTTCCCTC	297
Hu.DMD.Exón50.20.007	CCTTCCACTCAGAGCTCAGA	298
Hu.DMD.Exón50.20.008	GTAAACGGTTACCGCCTTC	299
Hu.DMD.Exón50.20.009	CCCTCAGCTCTGAAGTAAA	300
Hu.DMD.Exón50.20.010	GGTCAGGCTGCTTGCCCTC	301
Hu.DMD.Exón50.20.011	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCA	302
Hu.DMD.Exón50.20.012	AGGCTCCAATAGTGGTCAGT	303
Hu.DMD.Exón50.20.013	CTTACAGGCTCCAATAGTGG	304
Hu.DMD.Exón50.20.014	GTATACTTACAGGCTCCAAT	305
Hu.DMD.Exón50.20.015	ATCCAGTATACTTACAGGCT	306
Hu.DMD.Exón50.20.016	ATGGGATCCAGTATACTTAC	307
Hu.DMD.Exón50.20.017	AGAGAATGGGATCCAGTATA	308
Hu.DMD.Exón51.25.001-44	CTAAAATATTTGGGTTTTGCAAA	309
Hu.DMD.Exón51.25.002-45	GCTAAAATATTTGGGTTTTGCAAA	310
Hu.DMD.Exón51.25.002.2-46	TAGGAGCTAAATATTTGGGTTTT	311
Hu.DMD.Exón51.25.003	AGTAGGAGCTAAATATTTGGGTT	312
Hu.DMD.Exón51.25.003.2	TGAGTAGGAGCTAAATATTTGGG	313
Hu.DMD.Exón51.25.004	CTGAGTAGGAGCTAAATATTTGGG	314
Hu.DMD.Exón51.25.004.2	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAATATT	315
Hu.DMD.Exón51.25.005	ACAGTCTGAGTAGGAGCTAAATATT	316
Hu.DMD.Exón51.25.005.2	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAA	317
Hu.DMD.Exón51.25.006	CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCT	318
Hu.DMD.Exón51.25.006.2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG	319
Hu.DMD.Exón51.25.007	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAG	320
Hu.DMD.Exón51.25.007.2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG	321
Hu.DMD.Exón51.25.008	GTTGTGTCACCAGAGTAACAGTCTG	322
Hu.DMD.Exón51.25.009	TGGCAGTTCCCTAGTAACCACAGGT	323
Hu.DMD.Exón51.25.010	ATTCTAGTTGGAGATGGCAGTTTC	324
Hu.DMD.Exón51.25.010.2	GGAAGATGGCATTCTAGTTGGAG	325
Hu.DMD.Exón51.25.011	CATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTT	326
Hu.DMD.Exón51.25.011.2	TGGCAGTTCCCTAGTAACCACAGGT	327
Hu.DMD.Exón51.25.012	ATCTGCCAGAGCAGGTACCTCCAAC	328
Hu.DMD.Exón51.25.013	AAGTTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAAT	329
Hu.DMD.Exón51.25.013.2	CGGTTGAAATCTGCCAGAGCAGGTAC	330
Hu.DMD.Exón51.25.014	GAGAAAGCCAGTCGGTAAGTTCTGTC	331
Hu.DMD.Exón51.25.014.2	GTCGGTAAGTTCTGTCAGGCCGG	332
Hu.DMD.Exón51.25.015	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	333
Hu.DMD.Exón51.25.015.2	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGGTAAGT	334
Hu.DMD.Exón51.25.016	CACCCTCTGTGATTATAACTTGAT	335
Hu.DMD.Exón51.25.017	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	336
Hu.DMD.Exón51.25.017.2	CATCACCCCTCTGTGATTATAACT	337

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón51.25.018	CTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTGA	338
Hu.DMD.Exón51.25.019	CCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTG	339
Hu.DMD.Exón51.25.019.2	ATCTCGTTGATATCCTCAAGGTACCC	340
Hu.DMD.Exón51.25.020	TCATACCTTCTGCTTGATGATCATCT	341
Hu.DMD.Exón51.25.020.2	TCATTTTTCTCATACCTTCTGCTTG	342
Hu.DMD.Exón51.25.021	TTTCTCATACCTTCTGCTTGATGAT	343
Hu.DMD.Exón51.25.022	TTTATCATTTTCTCATACCTTCT	344
Hu.DMD.Exón51.25.023	CCAACTTTATCATTTTCTCATAC	345
Hu.DMD.Exón51.20.001	ATATTTGGGTTTGCAAA	346
Hu.DMD.Exón51.20.002	AAAATATTTGGGTTTG	347
Hu.DMD.Exón51.20.003	GAGCTAAAATATTTGGGTT	348
Hu.DMD.Exón51.20.004	AGTAGGAGCTAAAATATTTT	349
Hu.DMD.Exón51.20.005	GTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	350
Hu.DMD.Exón51.20.006	TAACAGTCTGAGTAGGAGCT	351
Hu.DMD.Exón51.20.007	CAGAGTAACAGTCTGAGTAG	352
Hu.DMD.Exón51.20.008	CACAGGTTGTGTCACCAGAG	353
Hu.DMD.Exón51.20.009	AGTTTCTTAGTAACCACAG	354
Hu.DMD.Exón51.20.010	TAGTTGGAGATGGCAGTT	355
Hu.DMD.Exón51.20.011	GGAAGATGGCATTCTAGTT	356
Hu.DMD.Exón51.20.012	TACCTCCAACATCAAGGAAG	357
Hu.DMD.Exón51.20.013	ATCTGCCAGAGCAGGTACCT	358
Hu.DMD.Exón51.20.014	CCAAGCCCAGGTGAAATCTG	359
Hu.DMD.Exón51.20.015	GTCGGAAGTTCTGTCCAAG	360
Hu.DMD.Exón51.20.016	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	361
Hu.DMD.Exón51.20.017	TTTTATAACTTGATCAAGCA	362
Hu.DMD.Exón51.20.018	CATCACCCCTGTGATTTA	363
Hu.DMD.Exón51.20.019	CTCAAGGTCACCCACCATCA	364
Hu.DMD.Exón51.20.020	CATCTCGTTGATATCCTCAA	365
Hu.DMD.Exón51.20.021	CTTCTGCTTGATGATCATCT	366
Hu.DMD.Exón51.20.022	CATACCTTCTGCTTGATGAT	367
Hu.DMD.Exón51.20.023	TTTCTCATACCTTCTGCTTG	368
Hu.DMD.Exón51.20.024	CATTTTTCTCATACCTTCT	369
Hu.DMD.Exón51.20.025	TTTATCATTTTCTCATAC	370
Hu.DMD.Exón51.20.026	CAACTTTTATCATTTTCT	371
Hu.DMD.Exón52.25.001	CTGTAAGAACAAATATCCCTAGTA	372
Hu.DMD.Exón52.25.002	TGCCTGTAAGAACAAATATCCCTTA	373
Hu.DMD.Exón52.25.002.2	GTTGCCTGTAAGAACAAATATCCCT	374
Hu.DMD.Exón52.25.003	ATTGTTGCCGTAAAGAACAAATATC	375
Hu.DMD.Exón52.25.003.2	GCATTGTTGCCGTAAAGAACAAATA	376
Hu.DMD.Exón52.25.004	CCTGCATTGTTGCCGTAAAGAACAA	377
Hu.DMD.Exón52.25.004.2	ATCCTGCATTGTTGCCGTAAAGAAC	378
Hu.DMD.Exón52.25.005	CAAATCTGCATTGTTGCCGTAAAG	379
Hu.DMD.Exón52.25.005.2	TCCAAATCCTGCATTGTTGCCGTAA	380
Hu.DMD.Exón52.25.006	TGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCC	381
Hu.DMD.Exón52.25.006.2	TCTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGC	382
Hu.DMD.Exón52.25.007	AACTGGGACGCCCTGTTCAAAT	383
Hu.DMD.Exón52.25.007.2	GCCTCTGTTCCAAATCCTGCATTGT	384
Hu.DMD.Exón52.25.008	CAGCGGTAATGAGTTCTCCAACTG	385
Hu.DMD.Exón52.25.008.2	CTTCCAACGGGACGCCCTGTT	386
Hu.DMD.Exón52.25.009	CTTGTTCCTCAAATTTGGGCAGCG	387
Hu.DMD.Exón52.25.010	CTAGCCTCTGATTGCTGGCTTGT	388
Hu.DMD.Exón52.25.010.2	TTTCAAAATTTGGGCAGCGTAAT	389
Hu.DMD.Exón52.25.011	TTCGATCCGTAAATGATTGTTCTAGC	390
Hu.DMD.Exón52.25.011.2	GATTGCTGGTCTGTTTCAAATT	391
Hu.DMD.Exón52.25.012	CTTACTTCGATCCGTAAATGATTGTT	392
Hu.DMD.Exón52.25.012.2	TTGTTCTAGCCTCTGATTGCTGGT	393
Hu.DMD.Exón52.25.013	AAAAACTTACCTCGATCCGTAAATGA	394
Hu.DMD.Exón52.25.014	TGTTAAAAAAACTTACTTCGATCCGT	395
Hu.DMD.Exón52.25.015	ATGCTGTTAAAAAAACTTACTTCGA	396
Hu.DMD.Exón52.25.016	GTCCCAGCTGTTAAAAAACTTAC	397
Hu.DMD.Exón52.20.001	AGAACAAATATCCCTTAGTA	398
Hu.DMD.Exón52.20.002	GTAAGAACAAATATCCCTTA	399
Hu.DMD.Exón52.20.003	TGCCTGTAAGAACAAATATC	400

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón52.20.004	ATTGTTGCCTGTAAGAACAA	401
Hu.DMD.Exón52.20.005	CCTGCATTGTTGCCTGTAAG	402
Hu.DMD.Exón52.20.006	CAAATCCTGCATTGTTGCCT	403
Hu.DMD.Exón52.20.007	GCCTCTGTTCCAAATCCTGC	404
Hu.DMD.Exón52.20.008	CTTCCAACGGGGACGCCCTC	405
Hu.DMD.Exón52.20.009	CAGCGGTAAATGAGTTCTTCC	406
Hu.DMD.Exón52.20.010	TTTCAAAATTTGGGCAGCG	407
Hu.DMD.Exón52.20.011	GATTGCTGGTCTGTTTTTC	408
Hu.DMD.Exón52.20.012	TTGTTCTAGCCTCTGATTG	409
Hu.DMD.Exón52.20.013	TTCGATCCGTAAATGATTGTT	410
Hu.DMD.Exón52.20.014	CTTACTTCGATCCGTAAATGA	411
Hu.DMD.Exón52.20.015	AAAAAACTTACTTCGATCCGT	412
Hu.DMD.Exón52.20.016	TGTTAAAAAAACTTACTTCGA	413
Hu.DMD.Exón52.20.017	ATGCTGTTAAAAAAACTTAC	414
Hu.DMD.Exón52.20.018	GTCCCAGTCTGTTAAAAAA	415
Hu.DMD.Exón53.25.001	CTAGAATAAAAGGAAAAATAATAT	416
Hu.DMD.Exón53.25.002	AACTAGAATAAAAGGAAAAATAAT	417
Hu.DMD.Exón53.25.002.2	TTCAACTAGAATAAAAGGAAAAATA	418
Hu.DMD.Exón53.25.003	CTTTCAACTAGAATAAAAGGAAAAAA	419
Hu.DMD.Exón53.25.003.2	ATTCTTCAACTAGAATAAAAGGAA	420
Hu.DMD.Exón53.25.004	GAATTCTTCAACTAGAATAAAAGG	421
Hu.DMD.Exón53.25.004.2	TCTGAATTCTTCAACTAGAATAAA	422
Hu.DMD.Exón53.25.005	ATTCTGAATTCTTCAACTAGAATA	423
Hu.DMD.Exón53.25.005.2	CTGATTCTGAATTCTTCAACTAGA	424
Hu.DMD.Exón53.25.006	CACTGATTCTGAATTCTTCAACTA	425
Hu.DMD.Exón53.25.006.2	TCCCAGTGAATTCTGAATTCTTCAA	426
Hu.DMD.Exón53.25.007	CATCCCAGTGAATTCTTCAA	427
Hu.DMD.Exón53.25.008	TACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	428
Hu.DMD.Exón53.25.008.2	CTGAAGGTGTTCTGTACTTCATCC	429
Hu.DMD.Exón53.25.009	CGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACT	430
Hu.DMD.Exón53.25.009.2	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	431
Hu.DMD.Exón53.25.010	TTTCATTCACACTGTTGCCTCCGGTT	432
Hu.DMD.Exón53.25.010.2	TAACATTCATTCAACTGTTGCCTC	433
Hu.DMD.Exón53.25.011	TTGTGTTGAATCCTTAACATTCA	434
Hu.DMD.Exón53.25.012	TCTTCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG	435
Hu.DMD.Exón53.25.012.2	CTTAGCTTCCAGCCATTGTGTTGAA	436
Hu.DMD.Exón53.25.013	GTCCTAACGACCTGCTCAGCTCTTC	437
Hu.DMD.Exón53.25.013.2	CTGCTCAGCTTCTCTTAGCTTCC	438
Hu.DMD.Exón53.25.014	CTCAAGCTTGGCTCTGGCTGTCC	439
Hu.DMD.Exón53.25.014.2	GGCCTGCTCTAACGACCTGCTCAGCT	440
Hu.DMD.Exón53.25.015	TAGGGACCCCTCTCCATGACTCAA	441
Hu.DMD.Exón53.25.016	TTTGGATTGCATCTACTGTATAGGG	442
Hu.DMD.Exón53.25.016.2	ACCCTCTTCCATGACTCAAGCTTG	443
Hu.DMD.Exón53.25.017	CTTGGTTCTGTGATTTCTTTGG	444
Hu.DMD.Exón53.25.017.2	ATCTACTGTATAGGGACCCCTCTTC	445
Hu.DMD.Exón53.25.018	CTAACCTGGTTCTGTGATTTCT	446
Hu.DMD.Exón53.25.018.2	TTTCTTTGGATTGCATCTACTGTA	447
Hu.DMD.Exón53.25.019	TGATACTAACCTGGTTCTGTGAT	448
Hu.DMD.Exón53.25.020	ATCTTGATAACTAACCTGGTTCT	449
Hu.DMD.Exón53.25.021	AAGGTATCTTGATAACTAACCTTGG	450
Hu.DMD.Exón53.25.022	TTAAAAAGGTATCTTGATAACTAAC	451
Hu.DMD.Exón53.20.001	ATAAAAGGAAAAATAATAT	452
Hu.DMD.Exón53.20.002	GAATAAAAGGAAAAATAAAAT	453
Hu.DMD.Exón53.20.003	AACTAGAATAAAAGGAAAAAA	454
Hu.DMD.Exón53.20.004	CTTCAACTAGAATAAAAGG	455
Hu.DMD.Exón53.20.005	GAATTCTTCAACTAGAATA	456
Hu.DMD.Exón53.20.006	ATTCTGAATTCTTCAACTA	457
Hu.DMD.Exón53.20.007	TACTTCATCCCACTGATTCT	458
Hu.DMD.Exón53.20.008	CTGAAGGTGTTCTGTACT	459
Hu.DMD.Exón53.20.009	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAA	460
Hu.DMD.Exón53.20.010	TAACATTCATTCAACTGTT	461
Hu.DMD.Exón53.20.011	TTGTGTTGAATCCTTAACA	462
Hu.DMD.Exón53.20.012	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG	463

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón53.20.013	CTGCTCAGCTCTCCCTAG	464
Hu.DMD.Exón53.20.014	GGCCTGCTCTAACAGACCTGCT	465
Hu.DMD.Exón53.20.015	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCT	466
Hu.DMD.Exón53.20.016	ACCCCTCCTCCATGACTCAA	467
Hu.DMD.Exón53.20.017	ATCTACTGTATAGGGACCCCT	468
Hu.DMD.Exón53.20.018	TTTCTTTGGATTGCATCTA	469
Hu.DMD.Exón53.20.019	CTTGGTTCTGTGATTTCT	470
Hu.DMD.Exón53.20.020	CTAACCTGGTTCTGTGAT	471
Hu.DMD.Exón53.20.021	TGATACTAACCTGGTTCT	472
Hu.DMD.Exón53.20.022	ATCTTGATACTAACCTTGG	473
Hu.DMD.Exón53.20.023	AAGGTATCTTGATACTAAC	474
Hu.DMD.Exón53.20.024	TTAAAAAGGTATCTTGATA	475
Hu.DMD.Exón54.25.001	CTATAGATTTTATGAGAAAGAGA	476
Hu.DMD.Exón54.25.002	AACTGCTATAGATTTTATGAGAAA	477
Hu.DMD.Exón54.25.003	TGGCCAAGTGTATAGATTTTATG	478
Hu.DMD.Exón54.25.004	GTCTTGGCCAAGTGTATAGATTT	479
Hu.DMD.Exón54.25.005	CGGAGGTCTTGGCCAAGTGTATA	480
Hu.DMD.Exón54.25.006	ACTGGCGGAGGTCTTGGCCAAGT	481
Hu.DMD.Exón54.25.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAGGTCTT	482
Hu.DMD.Exón54.25.008	AGTCATTGCCACATCTACATTGTG	483
Hu.DMD.Exón54.25.008.2	TTGCCACATCTACATTGTG	484
Hu.DMD.Exón54.25.009	CCGGAGAAGTTCAGGGCCAAGTCA	485
Hu.DMD.Exón54.25.010	GTATCATCTGCAGAATAATCCCAGA	486
Hu.DMD.Exón54.25.010.2	TAATCCCGGAGAAGTTTCAAGGGCCA	487
Hu.DMD.Exón54.25.011	TTATCATGTGGACTTTCTGGTATC	488
Hu.DMD.Exón54.25.012	AGAGGCATTGATATTCTCTGTTATC	489
Hu.DMD.Exón54.25.012.2	ATGTGGACTTTCTGGTATCATCTG	490
Hu.DMD.Exón54.25.013	CTTTTATGAATGCTCTCCAAGAGG	491
Hu.DMD.Exón54.25.013.2	ATATTCTGTTATCATGTGGACTT	492
Hu.DMD.Exón54.25.014	CATACCTTTATGAATGCTCTCCA	493
Hu.DMD.Exón54.25.014.2	CTCCAAGAGGCATTGATATTCTCTG	494
Hu.DMD.Exón54.25.015	TAATTCATACCTTTATGAATGCTT	495
Hu.DMD.Exón54.25.015.2	CTTTTATGAATGCTCTCCAAGAGG	496
Hu.DMD.Exón54.25.016	TAATGTAATTCATACCTTTATGAA	497
Hu.DMD.Exón54.25.017	AGAAATAATGTAATTCATACCTTT	498
Hu.DMD.Exón54.25.018	GTTTTAGAAATAATGTAATTAC	499
Hu.DMD.Exón54.20.001	GATTTTATGAGAAAGAGA	500
Hu.DMD.Exón54.20.002	CTATAGATTTATGAGAAA	501
Hu.DMD.Exón54.20.003	AAAATATTTGGGTTTTGC	502
Hu.DMD.Exón54.20.004	TGGCCAAGTGTATAGATTT	503
Hu.DMD.Exón54.20.005	GTCTTGGCCAAGTGTATA	504
Hu.DMD.Exón54.20.006	CGGAGGTCTTGGCCAAGT	505
Hu.DMD.Exón54.20.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAG	506
Hu.DMD.Exón54.20.008	TTGCCACATCTACATTGT	507
Hu.DMD.Exón54.20.009	TTCAGGGCCAAGTGTATTG	508
Hu.DMD.Exón54.20.010	TAATCCCGGAGAAGTTCA	509
Hu.DMD.Exón54.20.011	GTATCATCTGCAGAATAATC	510
Hu.DMD.Exón54.20.012	ATGTGGACTTTCTGGTATC	511
Hu.DMD.Exón54.20.013	ATATTCTGTTATCATGTG	512
Hu.DMD.Exón54.20.014	CTCCAAGAGGCATTGATATT	513
Hu.DMD.Exón54.20.015	CTTTTATGAATGCTCTCCA	514
Hu.DMD.Exón54.20.016	CATACCTTTATGAATGCTT	515
Hu.DMD.Exón54.20.017	TAATTCATACCTTTATGAA	516
Hu.DMD.Exón54.20.018	TAATGTAATTCATACCTTT	517
Hu.DMD.Exón54.20.019	AGAAATAATGTAATTAC	518
Hu.DMD.Exón54.20.020	GTTTTAGAAATAATGTAATT	519
Hu.DMD.Exón55.25.001	CTGCAAAGGACCAAATGTTAGATG	520
Hu.DMD.Exón55.25.002	TCACCCCTGCAAAGGACCAAATGTT	521
Hu.DMD.Exón55.25.003	CTCACTCACCTGCAAAGGACCAA	522
Hu.DMD.Exón55.25.004	TCTCGCTCACTCACCTGCAAAGGA	523
Hu.DMD.Exón55.25.005	CAGCCTCTCGCTCACTCACCTGCA	524
Hu.DMD.Exón55.25.006	CAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC	525
Hu.DMD.Exón55.25.007	TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	526

ES 2 955 539 T3

Hu.DMD.Exón55.25.007.2	TCTATGAGTTCTTCCAAAGCAGCC	527
Hu.DMD.Exón55.25.008	GTTGCAGTAATCTATGAGTTCTC	528
Hu.DMD.Exón55.25.008.2	GAACTGTTGCACTAATCTATGAGTT	529
Hu.DMD.Exón55.25.009	TTCCAGGTCCAGGGGAACTGTTGC	530
Hu.DMD.Exón55.25.010	GTAAGCCAGGCAAGAAACTTTC	531
Hu.DMD.Exón55.25.010.2	CCAGGCAAGAAACTTTCAGGTCC	532
Hu.DMD.Exón55.25.011	TGGCAGTTGTTTACGTTCTGTAAG	533
Hu.DMD.Exón55.25.011.2	TTCAGCTCTGTAAGCCAGGCAAGA	635
Hu.DMD.Exón55.25.012	GGTAGCATCCTGTAGGACATTGGCA	534
Hu.DMD.Exón55.25.012.2	GACATTGGCAGTTGTTTACGTTCT	535
Hu.DMD.Exón55.25.013	TCTAGGAGCCTTCCTTACGGGTAG	536
Hu.DMD.Exón55.25.014	CTTTTACTCCCTGGAGTCTTCTAG	537
Hu.DMD.Exón55.25.014.2	GAGCCTTCCTTACGGGTAGCATCC	538
Hu.DMD.Exón55.25.015	TTGCCATTGTTTACAGCTTTT	539
Hu.DMD.Exón55.25.015.2	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCCTTCC	540
Hu.DMD.Exón55.25.016	CTTACTTGCCATTGTTTACAGCT	541
Hu.DMD.Exón55.25.016.2	CAGCTTTTACTCCCTGGAGTCT	542
Hu.DMD.Exón55.25.017	CCTGACTTACTTGCCTTACGTTTAC	543
Hu.DMD.Exón55.25.018	AAATGCCTGACTTACTTGCCTTGT	544
Hu.DMD.Exón55.25.019	AGCGGAAATGCCTGACTTACTTGC	545
Hu.DMD.Exón55.25.020	GCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	546
Hu.DMD.Exón55.20.001	AAGGACCAAATGTTCAGATG	547
Hu.DMD.Exón55.20.002	CTGCAAAGGACCAAATGTTTC	548
Hu.DMD.Exón55.20.003	TCACCCCTGCAAAGGACCAA	549
Hu.DMD.Exón55.20.004	CTCACTCACCCCTGCAAAGGA	550
Hu.DMD.Exón55.20.005	TCTCGCTCACTCACCCCTGCA	551
Hu.DMD.Exón55.20.006	CAGCCTCTCGCTCACTCACC	552
Hu.DMD.Exón55.20.007	CAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	553
Hu.DMD.Exón55.20.008	TCTATGAGTTCTTCCAAAG	554
Hu.DMD.Exón55.20.009	GAACTGTTGCACTAATCTAT	555
Hu.DMD.Exón55.20.010	TTCCAGGTCCAGGGGAACT	556
Hu.DMD.Exón55.20.011	CCAGGCAGGAAACTTTC	557
Hu.DMD.Exón55.20.012	TTCAGCTCTGTAAGCCAGG	558
Hu.DMD.Exón55.20.013	GACATTGGCAGTTGTTTCA	559
Hu.DMD.Exón55.20.014	GGTAGCATCCTGTAGGACAT	560
Hu.DMD.Exón55.20.015	GAGCCTTCCTTACGGGTAG	561
Hu.DMD.Exón55.20.016	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCC	562
Hu.DMD.Exón55.20.017	CAGCTTTTACTCCCTTGG	563
Hu.DMD.Exón55.20.018	TTGCCATTGTTTACAGCT	564
Hu.DMD.Exón55.20.019	CTTACTTGCCATTGTTTAC	565
Hu.DMD.Exón55.20.020	CCTGACTTACTTGCCTTAC	566
Hu.DMD.Exón55.20.021	AAATGCCTGACTTACTTGC	567
Hu.DMD.Exón55.20.022	AGCGGAAATGCCTGACTTAC	568
Hu.DMD.Exón55.20.023	GCTAAAGCGGAAATGCCTGA	569
H50A(+02+30)-AVI-5656	CCACTCAGAGCTCAGATCTAAC	584
	c.	
H50D(+07-18)-AVI-5915	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	585
H50A(+07+33)	CTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTCAA	586
H51A(+61+90)-AVI-4657	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGTT	587
	GG	
H51A(+66+95)-AVI-4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCT	588
	AG	
H51A(+111+134)	TTCTGTCCAAGCCCCGGTTGAAATC	589
H51A(+175+195)	CACCCACCATCACCCCTCYGTG	590
H51A(+199+220)	ATCATCTCGTTGATATCCTCAA	591
H51A(+66+90)	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	592
H51A(-01+25)	ACCAAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGC	593
h51AON1	TCAAGGAAGATGGCATTCT	594
h51AON2	CCTCTGTGATTTATAACTTGT	595
H51 D(+08-17)	ATCATTTCCTCATACCTTCTGCT	596
H51D(+16-07)	CTCATACCTCTGCTTGTGATGATC	597
hAON#23	TGGCATTCTAGTTGG	598
hAON#24	CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC	599

ES 2 955 539 T3

H44A(+61 +84)	TGTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA	600
H44A(+85+104)	TTTGTGCTTTCTGAGAACAC	601
h44AON1	CGCCGCCATTCTCAACAG	602
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	603
H45A(+71 +90)	TGTTTTGAGGATTGCTGAA	604
h45AON1	GCTGAATTATTTCTCCCC	605
h45AON5	GCCCAATGCCATCTGG	606
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCTGTAA	607
H53A(+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAG	608
	GTG	
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTGTACTTCATCC	609
h53AON1	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	610
H53A(-12+10)	ATTCTTCAACTAGAATAAAAAG	611
huEx45.30.66	GCCATCCTGGAGTTCTGTAAAGATACCA	612
	AA	
huEx45.30.71	CCAATGCCATCCTGGAGTTCTGTAAAGA	613
	TA	
huEx45.30.79	GCCGCTGCCAATGCCATCCTGGAGTT	614
	CCT	
huEx45.30.83	GTTCGCCGCTGCCAATGCCATCCTGG	615
	AGT	
huEx45.30.88	CAACAGTTGCCGCTGCCAATGCCAT	616
	CCT	
huEx45.30.92	CTGACAACAGTTGCCGCTGCCAATG	617
	CCA	
huEx45.30.96	TGTTCTGACAACAGTTGCCGCTGCCA	618
	AT	
huEx45.30.99	CAATGTTCTGACAACAGTTGCCGCTGC	619
	CC	
huEx45.30.103	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTGCCG	620
	CT	
huEx45.30.120	TATTCCTCCCCAGTTGCATTCAATGTT	621
	T	
huEx45.30.127	GCTGAATTATTCCTCCCCAGTTGCATT	622
	CA	
huEx45.30.132	GGATTGCTGAATTATTCCTCCCCAGTT	623
	GC	
huEx45.30.137	TTTGAGGATTGCTGAATTATTCCTCCC	624
	CA	
huEx53.30.84	GTACTTCATCCCACTGATTCTGAATTCTT	625
	T	
huEx53.30.88	TCTTGTACTTCATCCCACTGATTCTGAAT	626
	T	
huEx53.30.91	TGTTCTTGTACTTCATCCCACTGATTCT	627
	GA	
huEx53.30.103	CGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACTTCAT	628
	CC	
huEx53.30.106	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTACTT	629
	CA	
huEx53.30.109	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTAA	630
	CT	
huEx53.30.112	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTAA	631
	CT	
huEx53.30.115	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTGTAA	632
	CT	

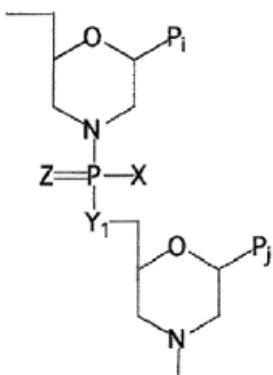
ES 2 955 539 T3

huEx53.30.118	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC CT	633
h50AON 1		
h50AON2		
Transportadores de péptidos (NH ₂ a COOH)*:		
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC	571
(RRAhx) ₄ B	RRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	575
(RAhx) ₈ B	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	576
(RAhxR) ₅ AhxB	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxB	577
(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CPO6062)	RAhxRRBRRAhxRRBRRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579
Péptido de penetración celular / Péptido de localización / Conjugados de OMF (NH ₂ a COOH y 5' a 3')		
MSP-OMF	ASSLN IA-XB-GGCCAACCTCGGCTTACCTGAAAT	580
		636
CP06062-MSP-OMF	RXRRBRRXRRBR-XB-ASSLNIA-X-GGCCAACCTCGGCTTACCTGAAAT	581 636
MSP-CP06062-OMF	ASSLNIA-X-RXRRBRRXRRBR-B-GGCCAACCTCGGCTTACCTGAAAT	582 636
CP06062-OMF	RXRRBRRXRRBR-XB-GGCCAACCTCGGCTTACCTGAAAT	583 636

*Ahx es ácido 6-aminohexanoico y B es beta-alanina.

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido antisentido que contiene 20 a 35 subunidades morfolino unidas mediante enlaces intersubunidad que contienen fósforo que unen un nitrógeno de morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de una subunidad contigua, que comprende una secuencia de bases SEC ID nº 287, o una secuencia que presenta una identidad de secuencias con la misma de por lo menos 80%, donde el oligonucleótido antisentido es complementario al pre-ARNm de la distrofina humana, induciendo la omisión del exón 50, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 5 2. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el enlace intersubunidad que une dos subunidades de morfolino adyacentes tiene la siguiente estructura:



- 15 donde:
X se selecciona del grupo que consiste en NH₂, N(CH₃)₂ y 1-piperazinilo opcionalmente sustituido:
Y₁ es O;
Z es O; y
20 P_i y P_j son una fracción de apareamiento con base purina o pirimidina eficaz para la unión, mediante enlace de hidrógeno específico de base, a una base en un polinucleótido, la fracción de apareamiento con base purina o pirimidina que se selecciona del grupo que consiste en adenina, citosina, guanina, uracilo, timina e inosina, donde las fracciones de apareamiento con base forman la secuencia de bases.
- 25 3. El oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1 o reivindicación 2 o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, que se conjuga a un péptido rico en arginina.
4. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 30 5. El oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o la composición según la reivindicación 4, para la utilización en el tratamiento de la distrofia muscular.
- 35 6. Oligonucleótido antisentido o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 5, en el que la distrofia muscular es la distrofia muscular de Duchenne (DMD).
- 40 7. Oligonucleótido antisentido o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 5, en el que la distrofia muscular es la distrofia muscular de Becker (DMB).

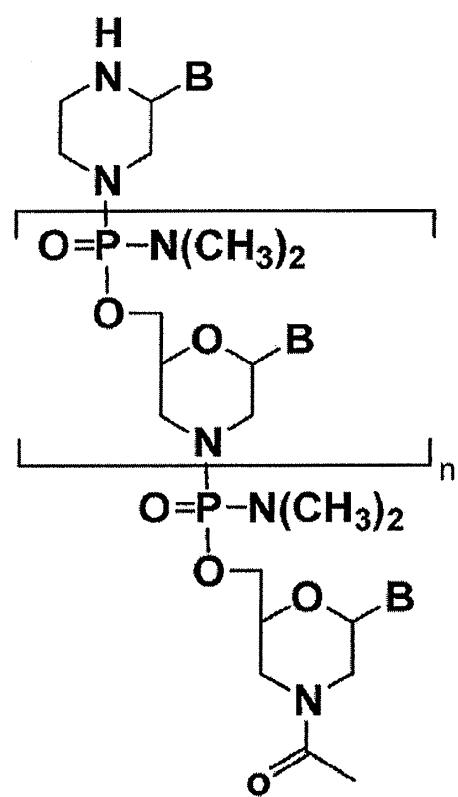


FIG. 1A

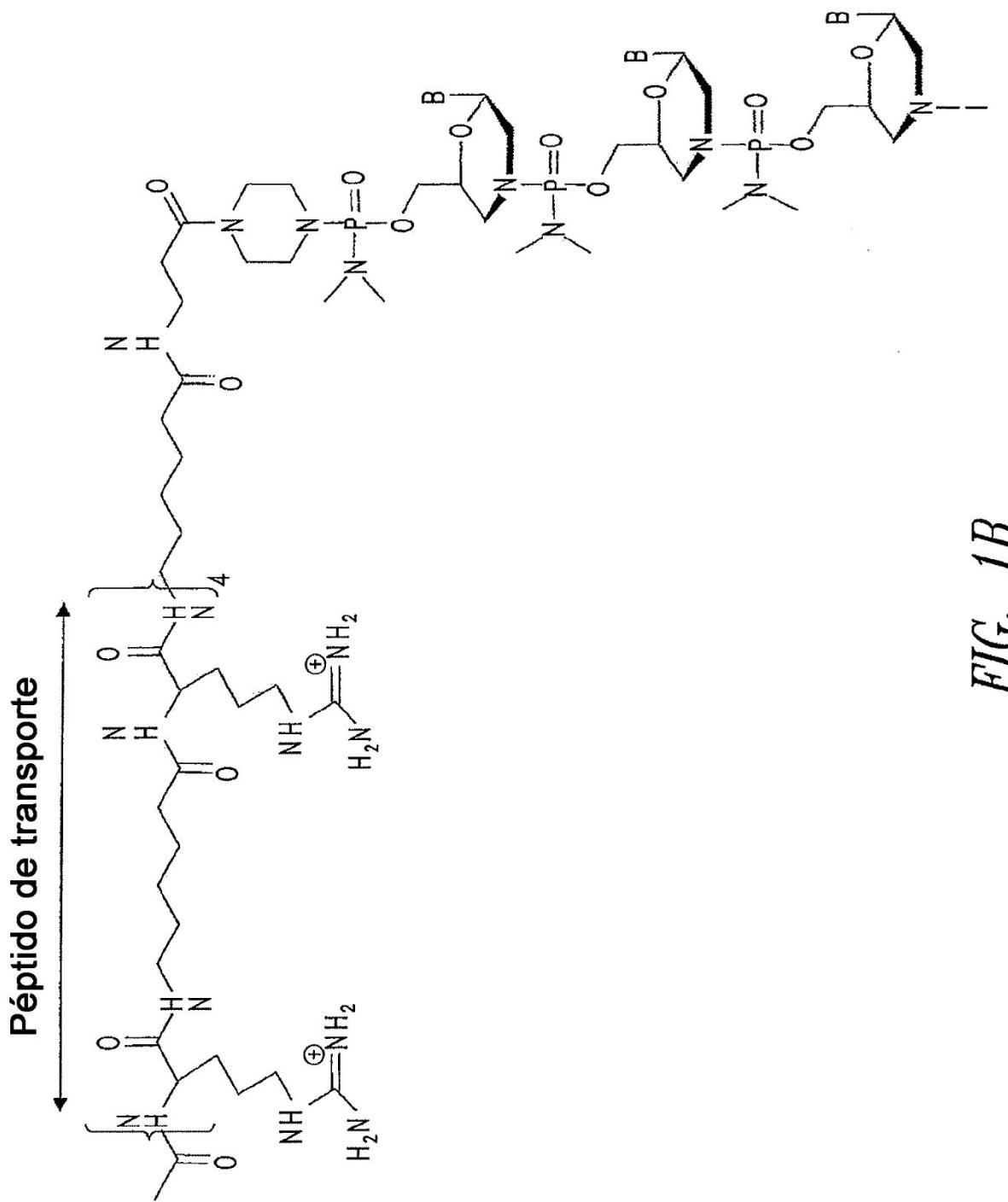


FIG. 1B

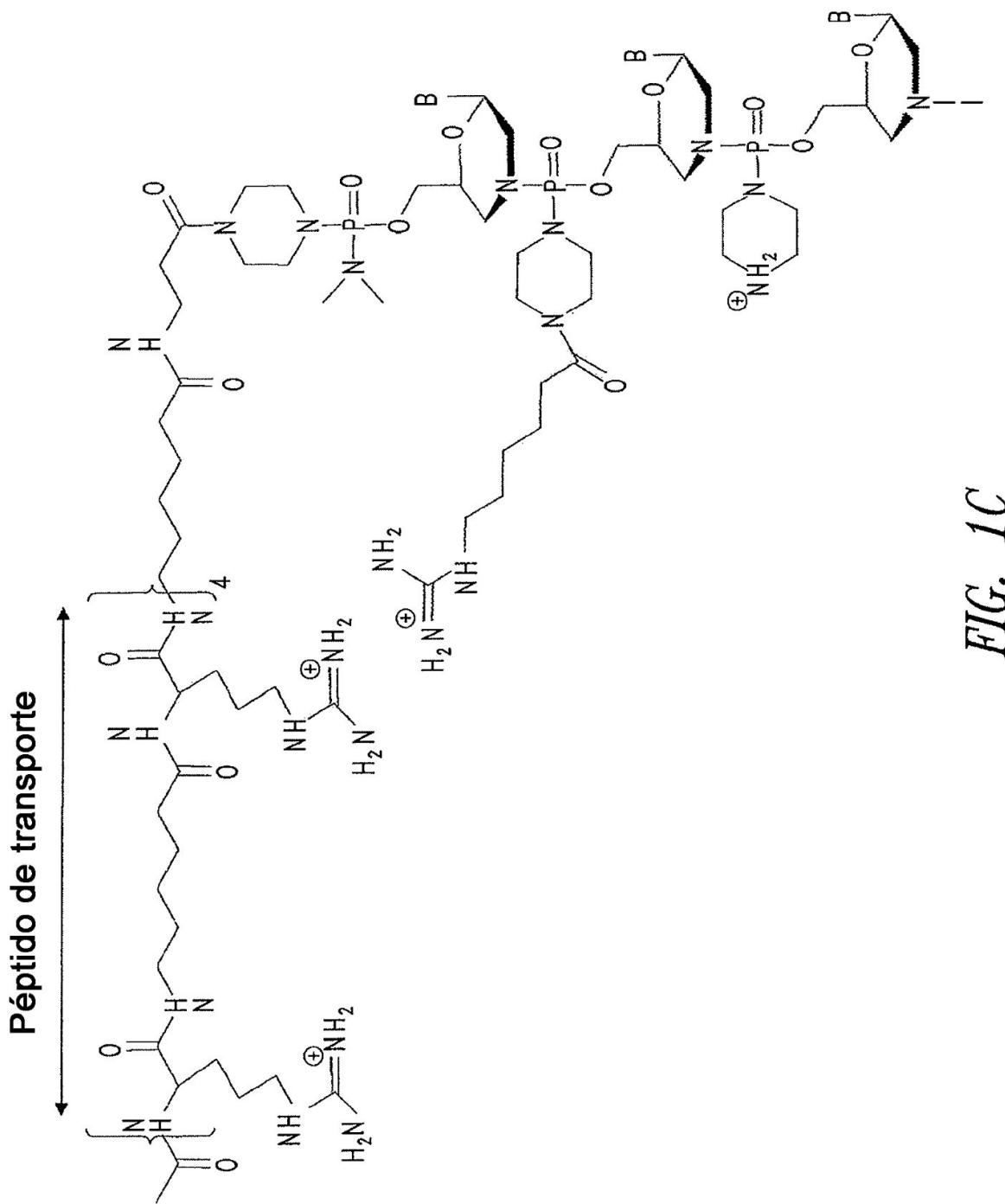


FIG. 1C

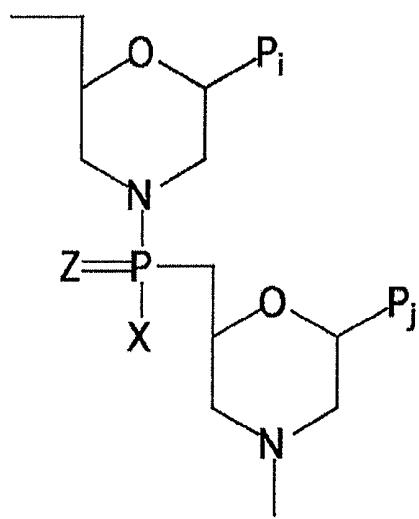


FIG. 1D

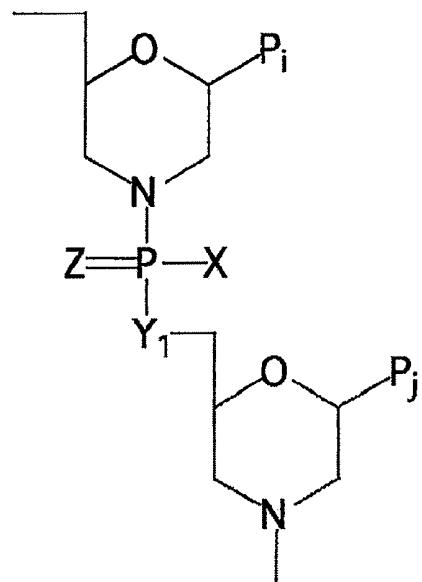


FIG. 1E

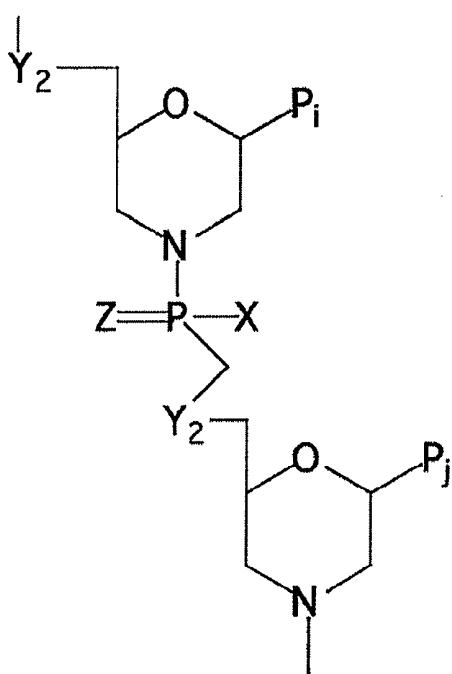


FIG. 1F

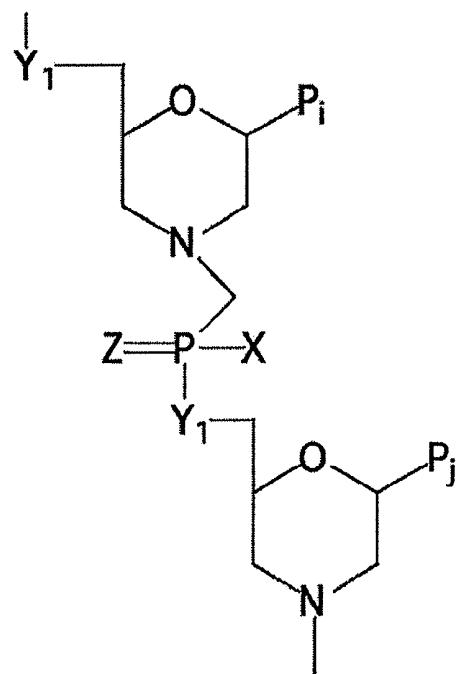
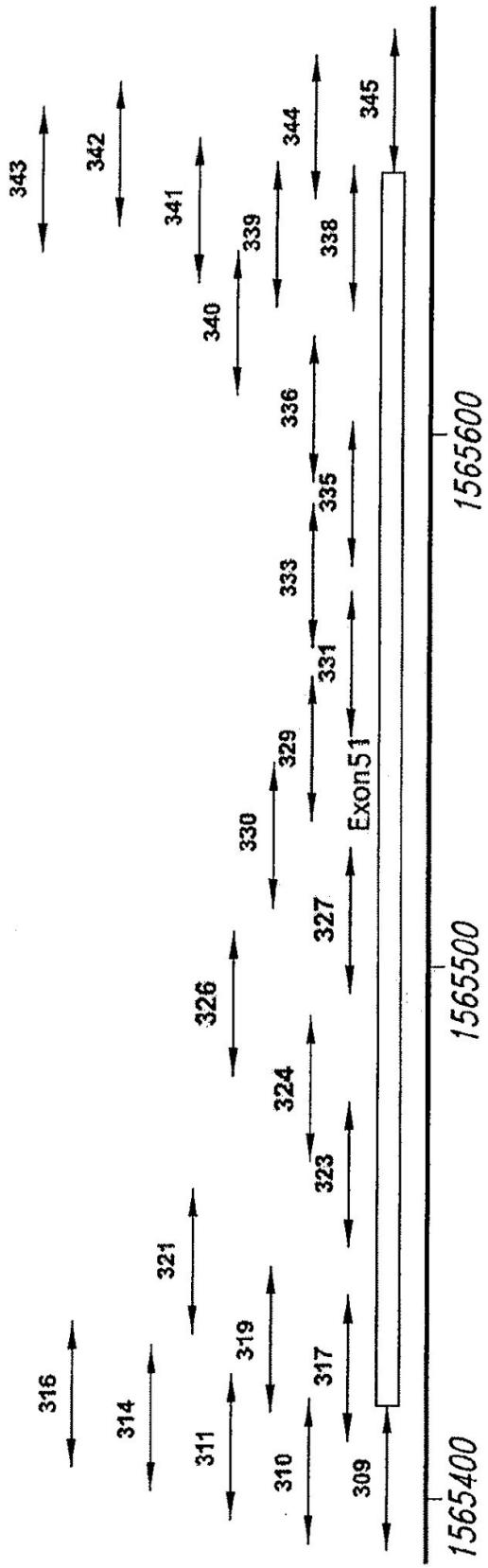


FIG. 1G

Oligos del escaneo del exón 51 de la distrofina

DMD Gen 1756 -



SEC ID nº de oligos mostrados - las SEC ID nº 324, 326 y 327 fueron las más eficaces

FIG. 2A

Exón 5'1S.3 (RD)

Síntesis de alta pureza, 3,0 µM, células RD

ES 2 955 539 T3

Oligo	Nombre, SEC ID nº	Lote
NG-07-1160	AVI-56558; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JNJ12-R(E4)

NG-09-0053 (SEC ID nº 324)	NG-09-0054 (SEC ID nº 326)	NG-09-0055 (SEC ID nº 327)	NG-07-1160 (SEC ID nº 588)
4,65% ±1,89	7,40% ±0,75	9,89% ±1,37	5,26% ±0,66

FIG. 2B

51MCS (Cribado de competidores de células musculares)

Síntesis de alta pureza, 3,0 μM , células primarias de músculo esquelético humano

Oligo	Nombre, SEC ID nº	Lote
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JNJ12-R(E4)
NG-08-0835	h51AON1; 594	09JU07-R(A1)

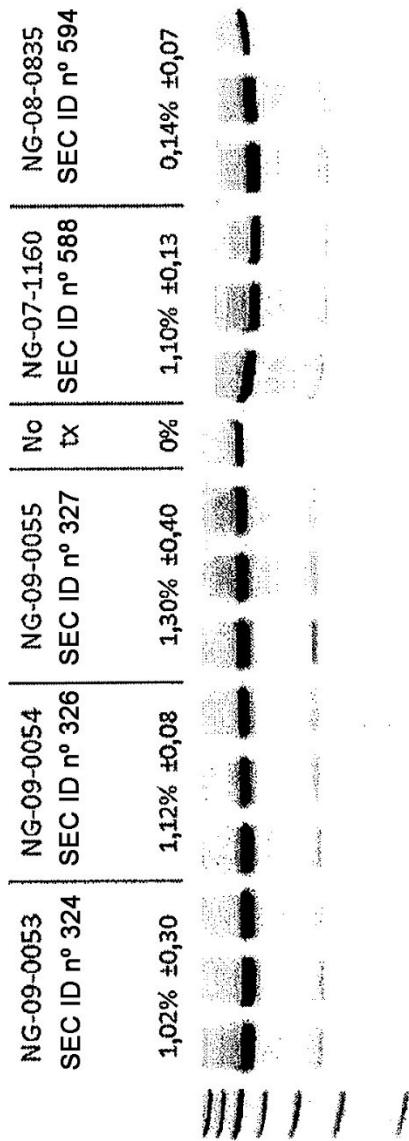


FIG. 2C

Oligos de exón 51 de distrofina seleccionados

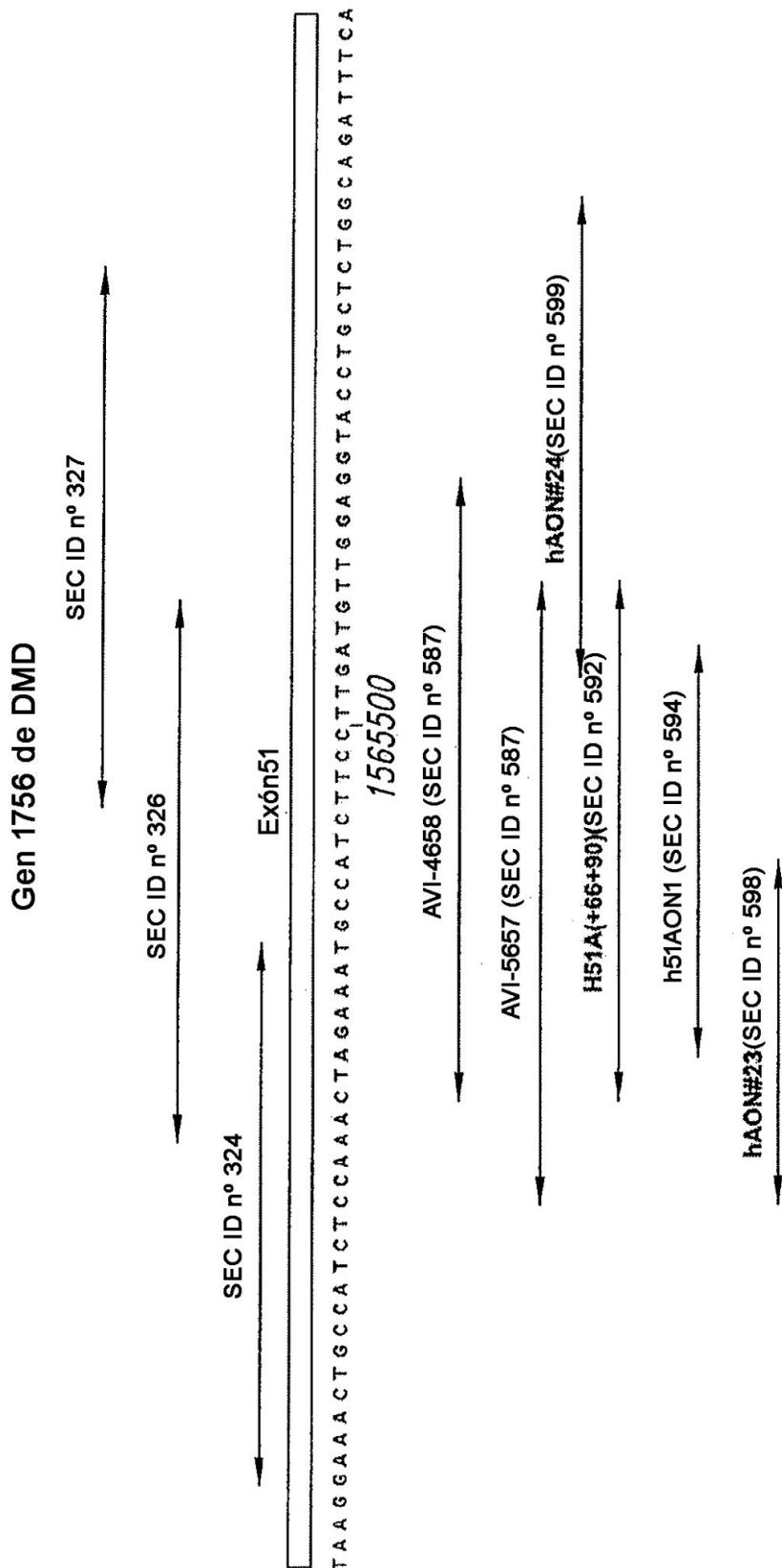


FIG. 2D

Oligos de escaneo del exón 50 de la distrofina

Gen 1756 de DMD

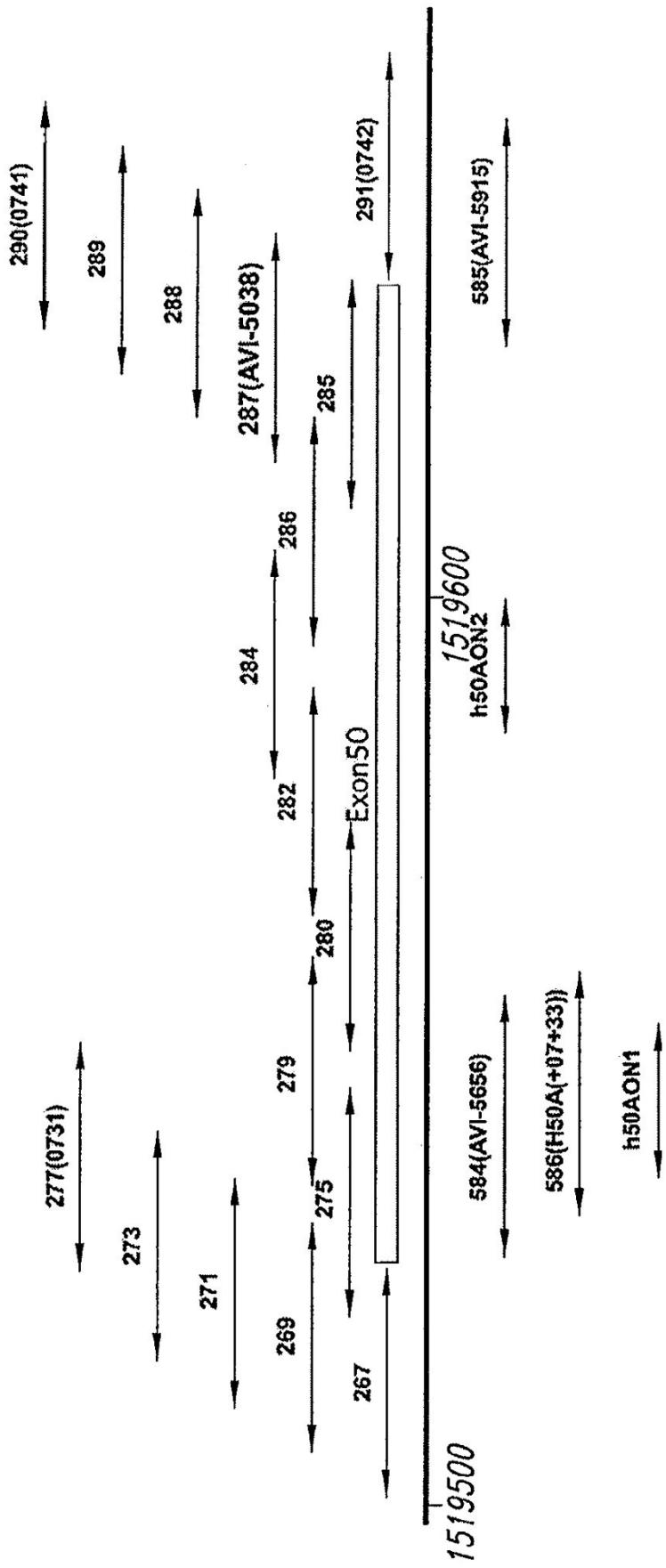
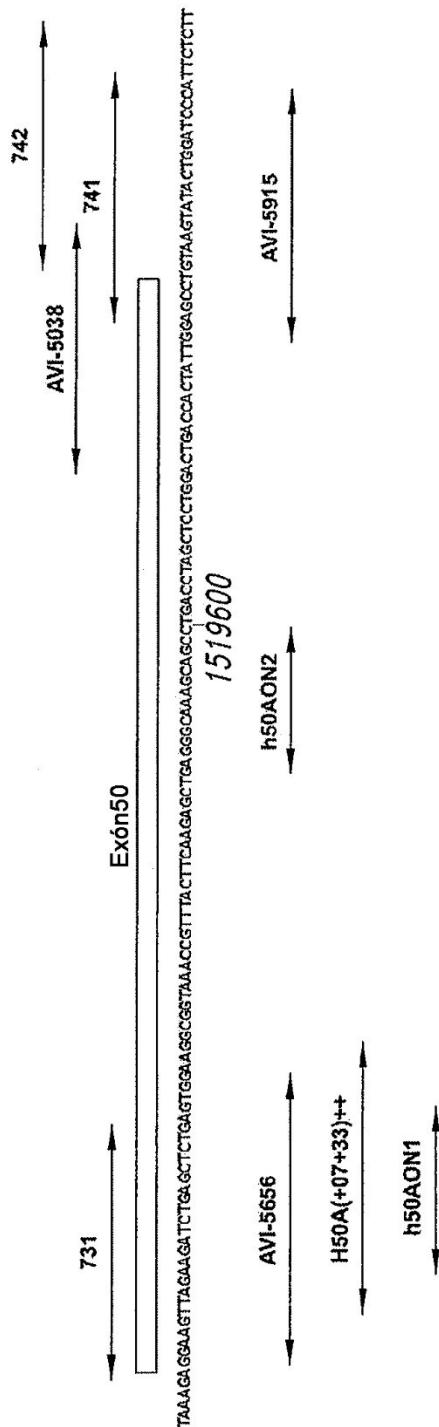


FIG. 3A

Oligos seleccionados del exón 50 de la distrofina

Gen 1756 de DMD



Compuesto	EC ₅₀ (micromolar)*
AVI-5656 (SEC ID nº 584)	0,921
AVI-5915 (SEC ID nº 585)	3,693
NG-08-0731 (SEC ID nº 277)	1,741
AVI-5038 (SEC ID nº 287)	0,966
NG-08-0741 (SEC ID nº 290)	1,836
NG-08-0742 (SEC ID nº 291)	2,402

* Determinado en estudios de determinación de dosis en células RD
AVI nº 00453 - 02 FEB 2009

FIG. 3B

Oligos del escaneo del exón 53 de la distrofina

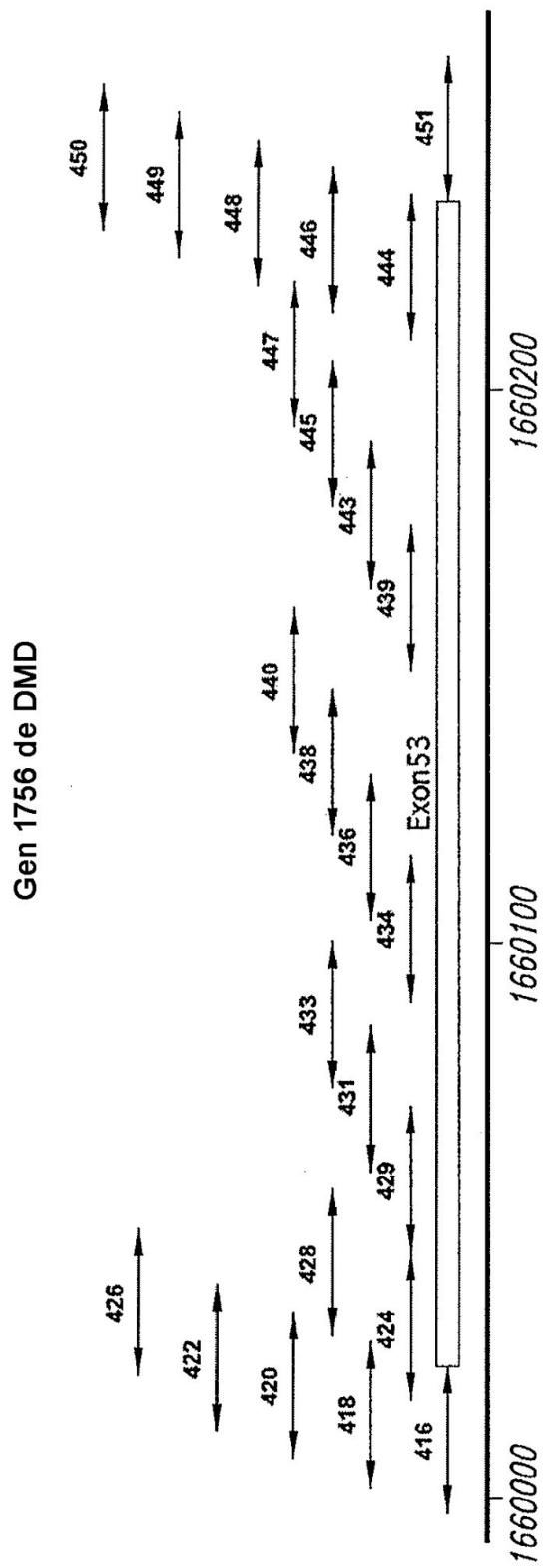


FIG. 4A

Oligos seleccionados del exón 53 de la distrofina

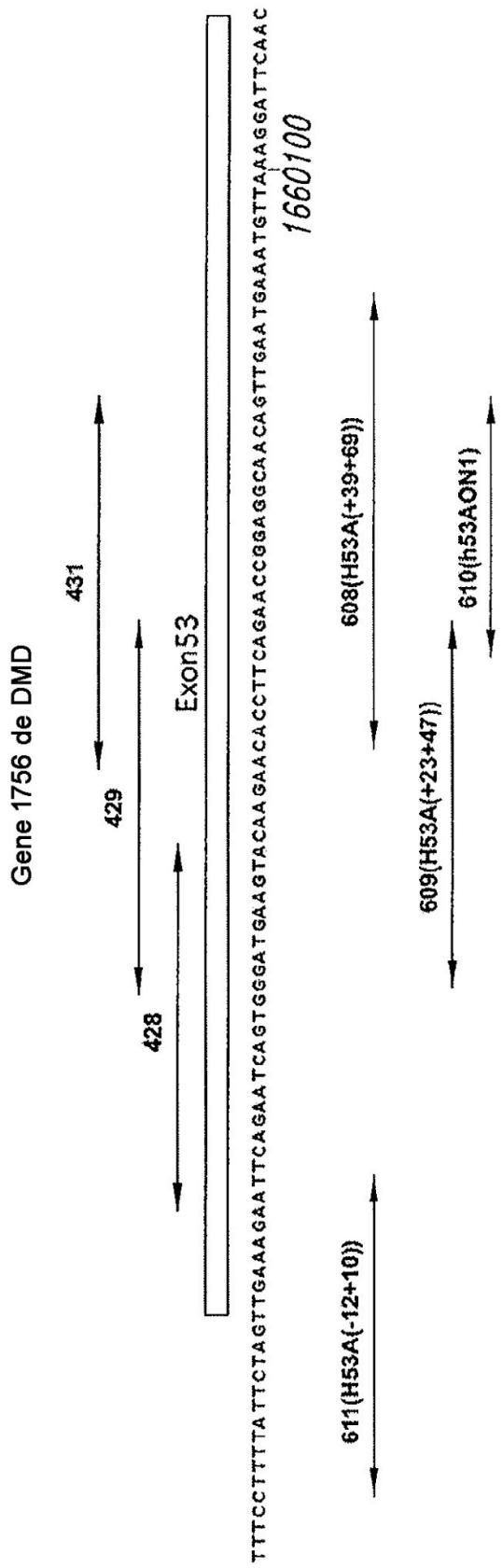


FIG. 4B

Exón 53 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0746 09AU11-R(E5) (SEC ID nº 422)



FIG. 4C

Exón 53 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0749 09AU11-R(A7)(SEC ID nº 428)

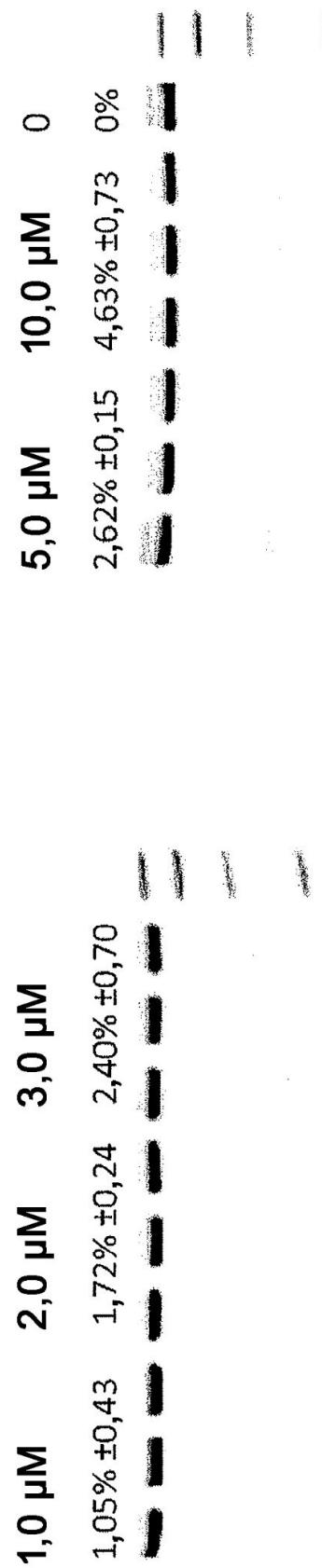


FIG. 4D

Exón 53 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0750 09AU11-R(C7) (SEC ID nº 429)



FIG. 4E

Exón 53 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0751 09AU11-J(E7) (SEC ID nº 431)

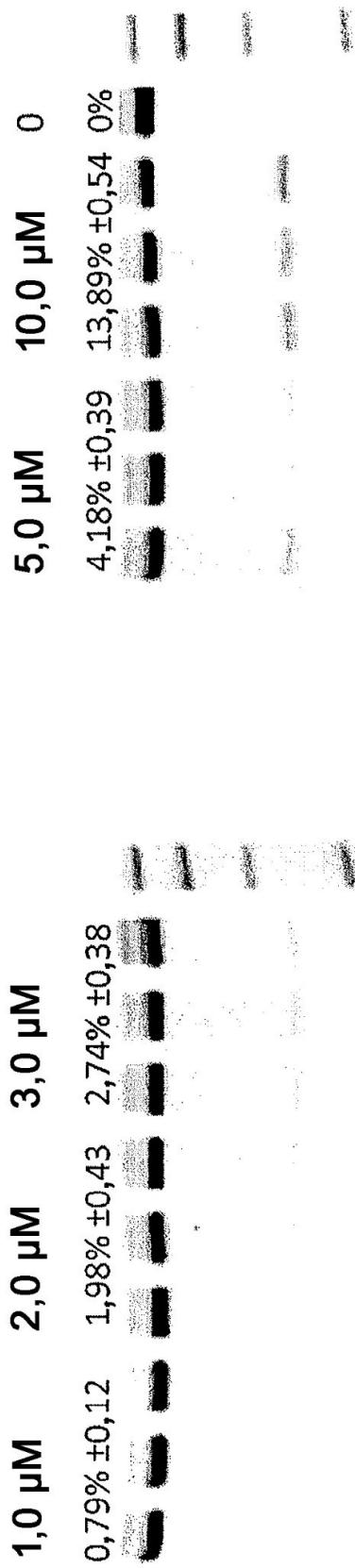


FIG. 4F

Resumen de determinación de dosis de exón 53 en células RD

Porcentaje de exones omitidos

Tratamiento (μ M)	746 (SEC ID nº 422)	749 (SEC ID nº 428)	750 (SEC ID nº 429)	751 (SEC ID nº 431)
1,0	0,00	1,05	4,83	0,79
2,0	0,00	1,72	10,44	1,98
3,0	0,00	2,40	17,28	2,74
5,0	0,54	2,62	23,29	4,18
10	3,53	4,63	57,67	13,89
EC ₅₀ (μ M)	NA	72,2	9,3	25,3

FIG. 4G

Exón 53 CS (Cribado de competidores)

Síntesis de alta pureza, 3,0 μ M, células RD

<u>Oligo</u>	<u>Nombre, SEC ID</u>	<u>Lote</u>
NG-09-0490	H53A(+39+69); 608	09AU18-J(A1)
NG-08-0750 (W)	H53A(+23+47); 609	09-AU18-J(B1)
NG-09-0559	h53AON1; 610	09AU18-J(C1)
NG-09-0560	H53A(-12+10); 611	09AU18-J(D1)
NG-08-0750	008; 429	09AU11-R(C7)

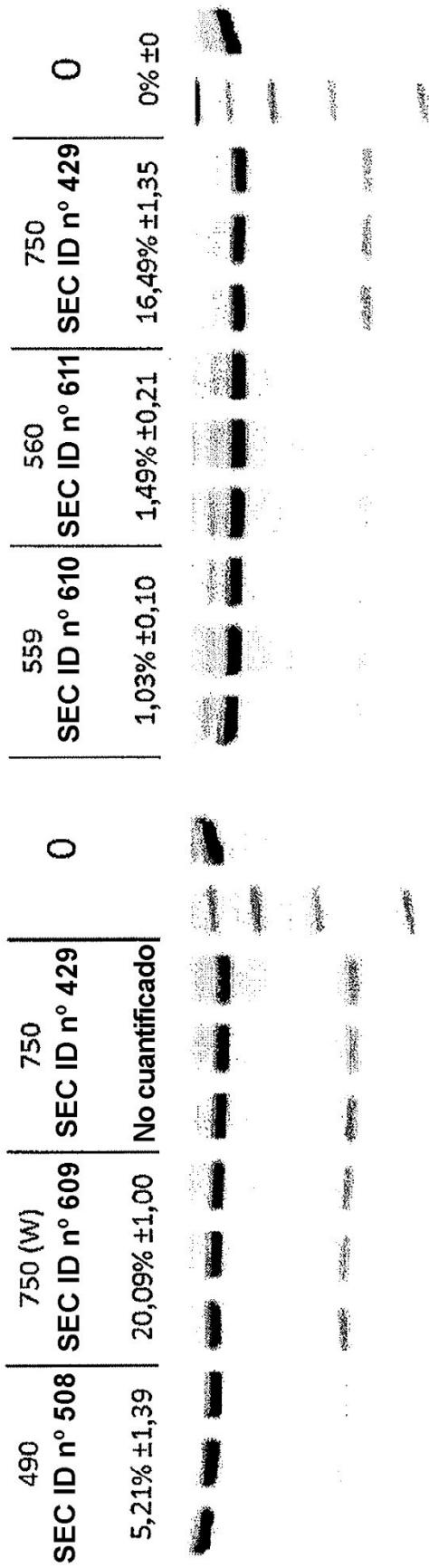


FIG. 4H

Exón 53 MCS (Cribado de competidores en células musculares)

Síntesis de alta pureza, 3,0 µM, Células primarias de músculo esquelético humano

<u>Oligo</u>	<u>Nombre SEC ID</u>	<u>Lote</u>
NG-09-0490	H53A(+39+69); 608	09AU18-J(A1)
NG-08-0750 (W)	H53A(+23+47); 609	09-AU18-J(B1)
NG-09-0559	h53AON1; 610	09AU18-J(C1)
NG-09-0560	H53A(-12+10); 611	09AU18-J(D1)
NG-08-0750	008; 429	09AU11-R(C7)

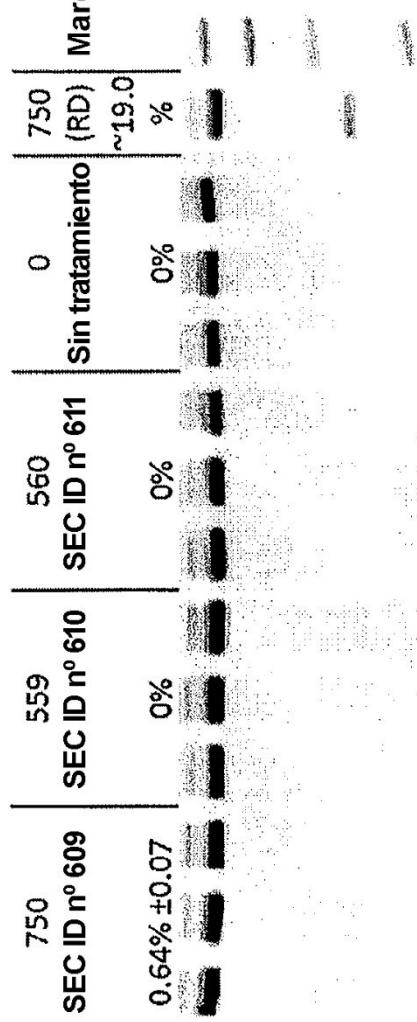


FIG. 4I

Oligos de escaneo del exón 44 de la distrofina

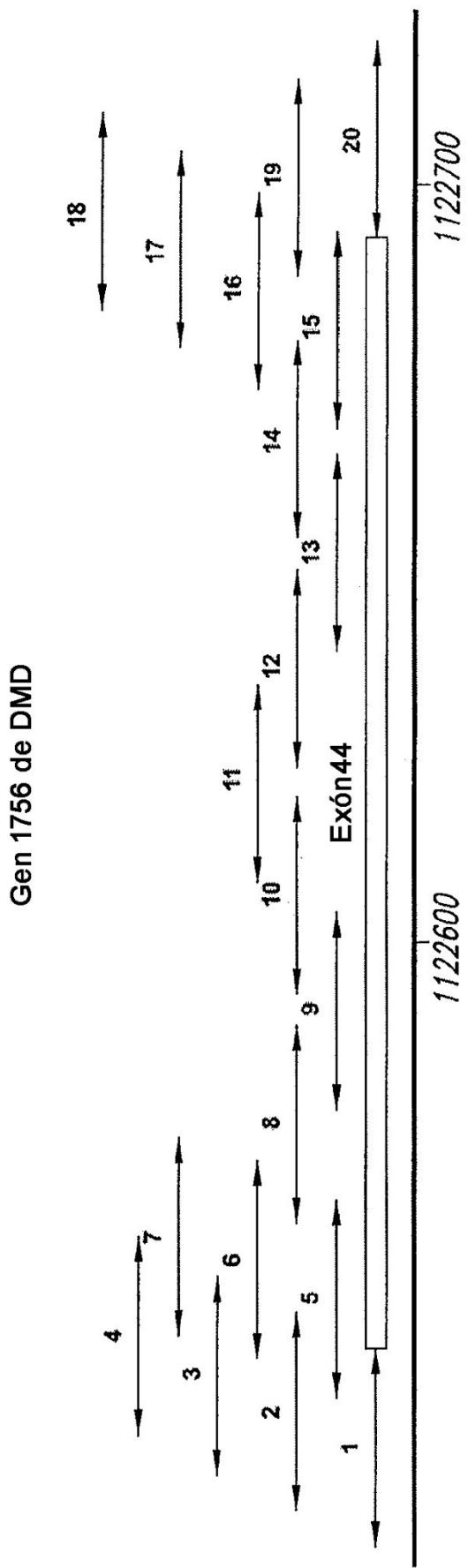


FIG. 5A

Oligos seleccionados del exón 44 de la distrofina

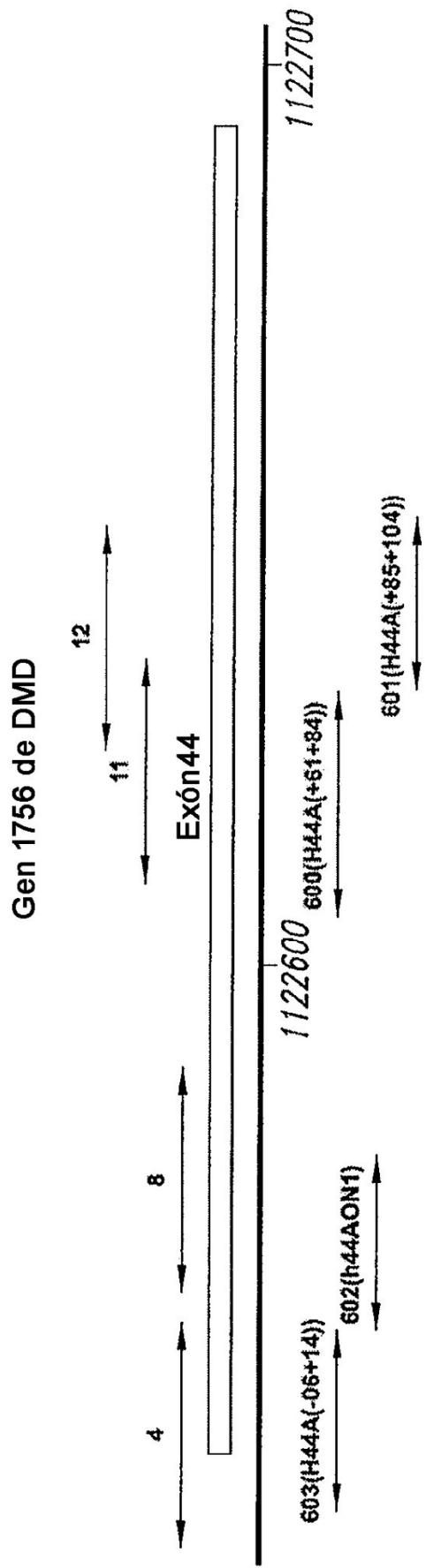


FIG. 5B

Exón 44 DR.2 (Rango de dosis)

Síntesis de alta pureza (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 μM) Células RD

NG-08-0792 09AU11-J(A2) (SEC ID nº 4)

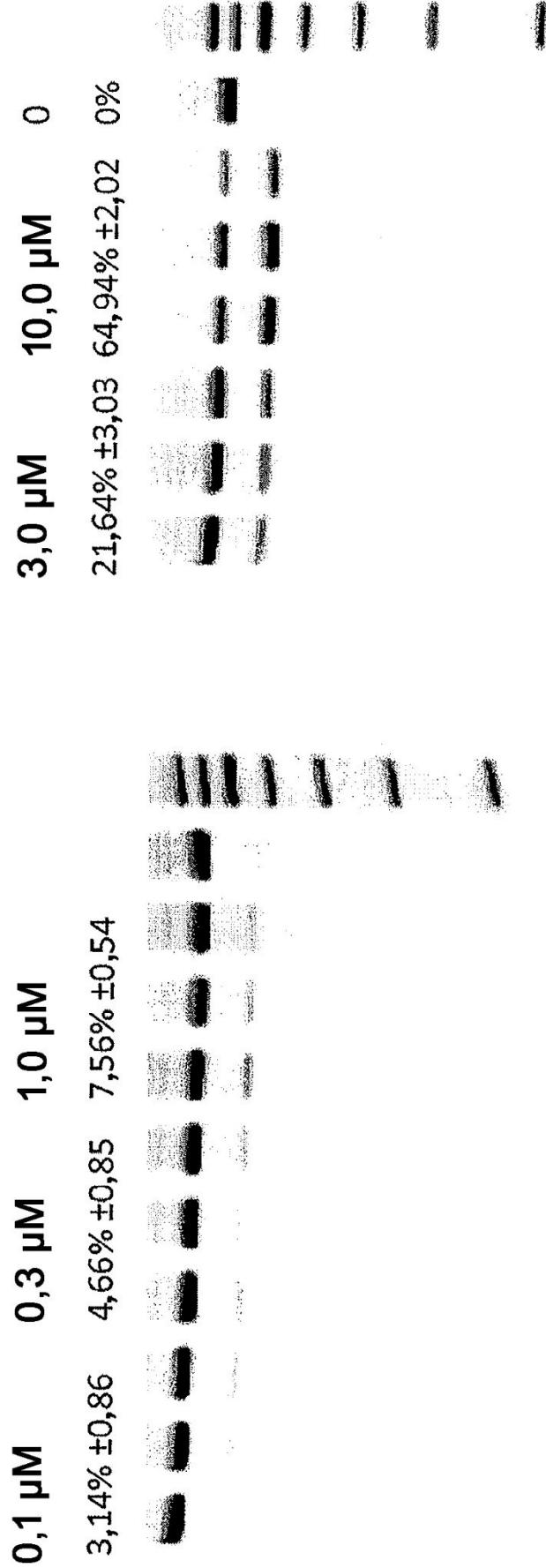


FIG. 5C

Exón 44 DR.2

Síntesis de alta pureza (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 μM) Células RD

NG-08-0796 09AU11-J(B2) (SEC ID nº 8)

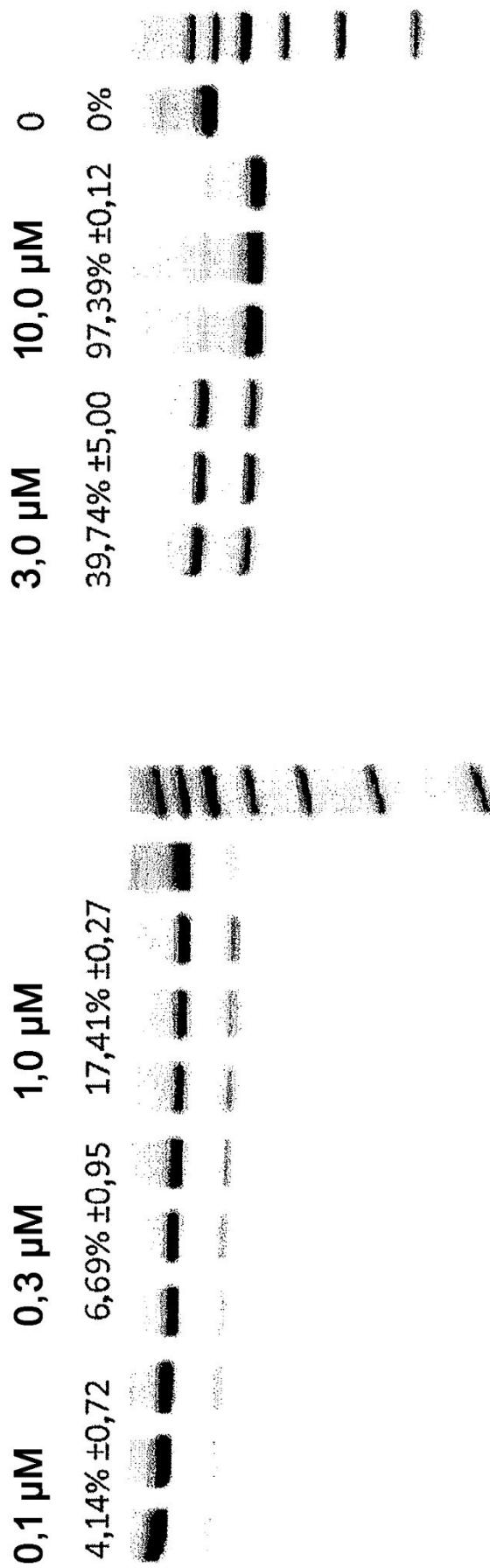


FIG. 5D

Exón 44 DR.2

Síntesis de alta pureza (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 μM) Células RD

NG-08-0799 09AU11-J(C2) (SEC ID nº 11)

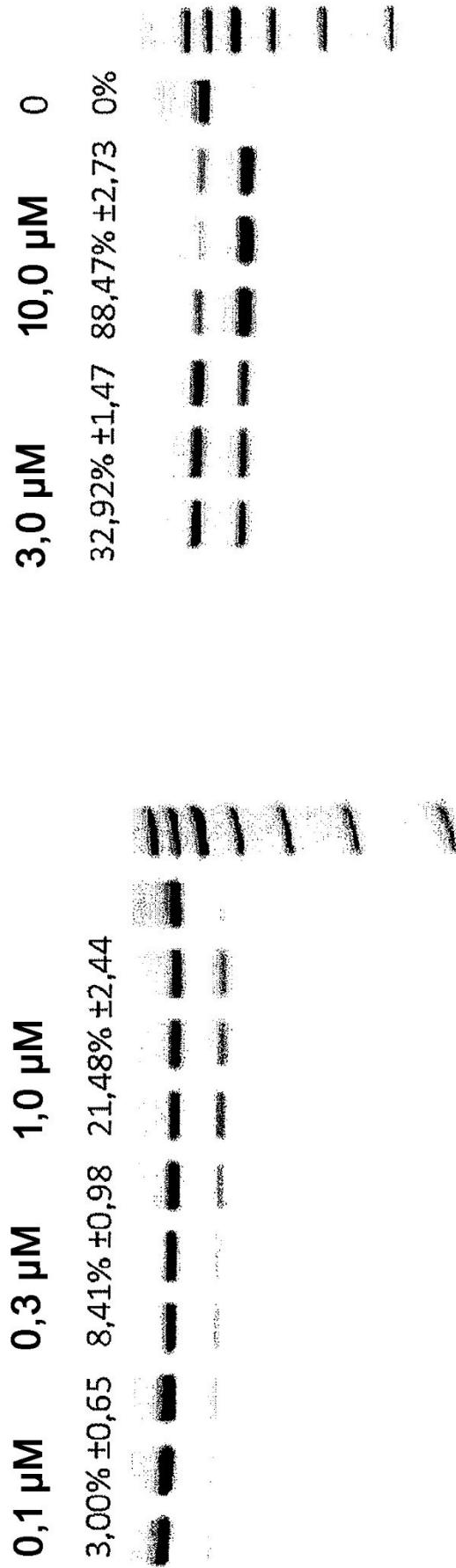


FIG. 5E

Exón 44 DR.2

Síntesis de alta pureza (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 μM) Células RD

NG-08-0800 09AU11-J(D2) (SEC ID nº 12)

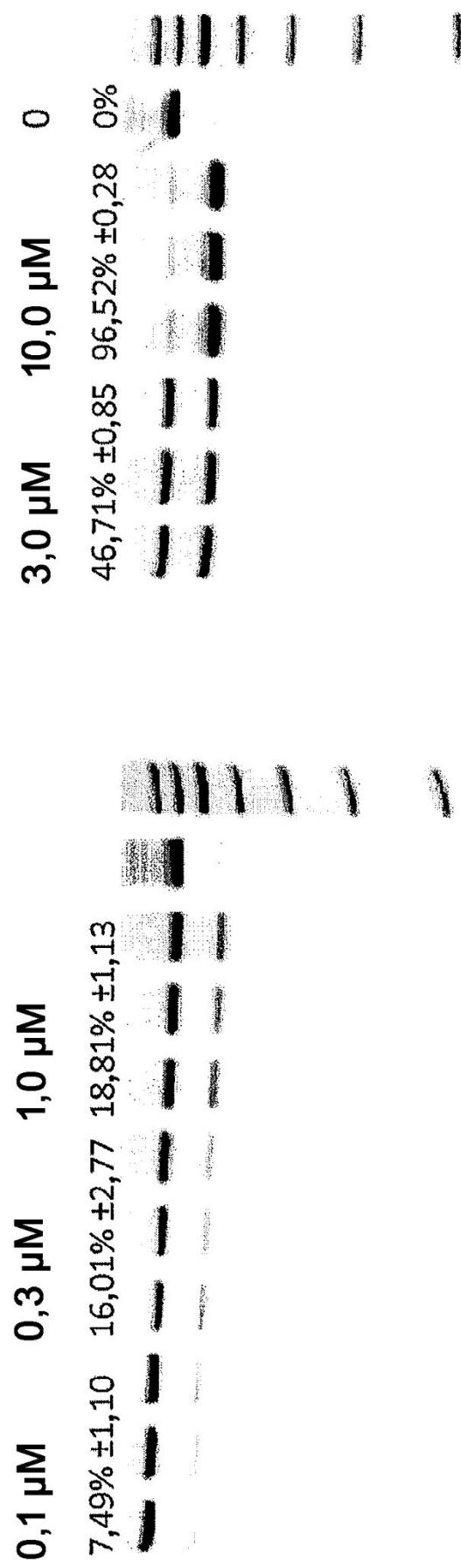


FIG. 5F

Exón 44 DR.2

Síntesis de alta pureza (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0801 09AU11-J(E2) (SEC ID nº 13)

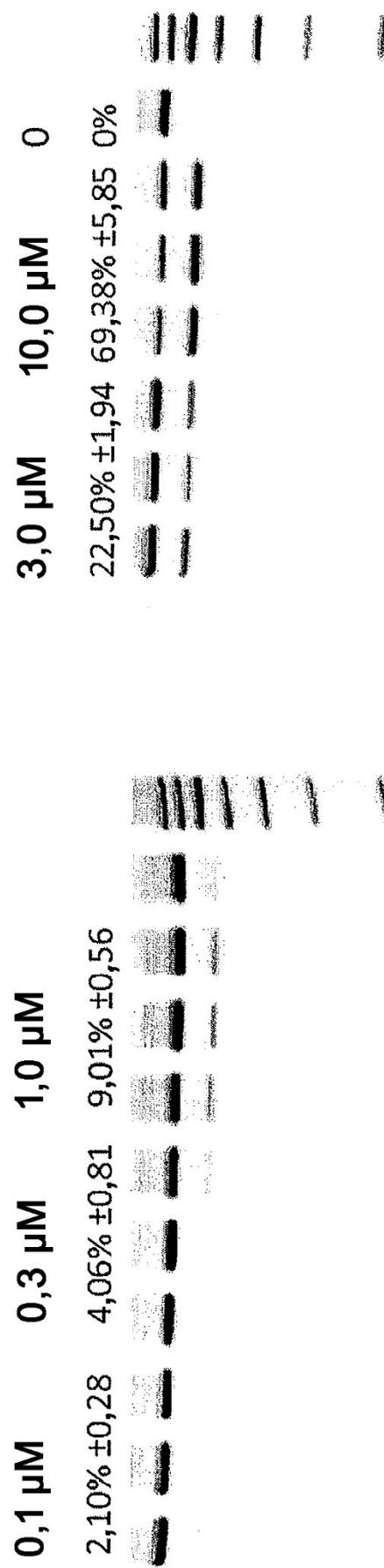


FIG. 5G

Resumen de rango de dosis de exón 44 en células R

Porcentaje con omisión exónica

Tratamiento (μ M)	792 (SEC ID nº 4)	796 (SEC ID nº 8)	799 (SEC ID nº 11)	800 (SEC ID nº 12)	801 (SEC ID nº 13)
0,1	3,14	4,14	3,00	7,49	2,10
0,3	4,66	6,69	8,41	16,01	4,06
1	7,56	17,41	21,48	18,81	9,01
3	21,64	39,74	32,92	46,71	22,50
10	64,94	97,39	88,47	96,52	69,38
EC ₅₀ (μ M)	7,166	3,024	3,594	2,795	6,277

Exón 44 CS (Cribado de competidores)

Síntesis de alta pureza, 3,0 µM, Células RD

<u>Oligo</u>	<u>Nombre, ID de sec.</u>	<u>Lote</u>
NG-09-0561	H44A(+61+84); 600	09AU18-J(E1)
NG-09-0562	H44A(+85+104); 601	09AU18-J(F1)
NG-09-0563	H44AON1; 602	09AU18-J(A2)
NG-09-0564	H44A(-06+14); 603	09AU18-J(B2)
NG-08-0800	012; 12	09AU11-J(D2)
561	562	564
SEC ID n°	SEC ID n°	SEC ID n°
600	601	603
SEC ID n°	800	800
	SEC ID n° 12	SEC ID n° 12
		PM 0
		0%
44,4% ±4,22	20,4% ±0,84	No cuantificado

FIG. 5I

Exón 44 MCS (Cribado de competidores de célula muscular)

Síntesis de alta pureza, 3,0 μ M, Células primarias de músculo esquelético humano

<u>Oligo</u>	<u>Nombre, ID de sec.</u>	<u>Lote</u>
NG-09-0561	H44A(-+61+84); 600	09AU18-J(E1)
NG-09-0562	H44A(+85+104); 601	09AU18-J(F1)
NG-09-0563	h44AON1; 602	09AU18-J(A2)
NG-09-0564	H44A(-06+14); 603	09AU18-J(B2)
NG-08-0800	012; 12	09AU11-J(D2)

inadecuado incluir NG-09-0564 en el cribado

800 8,86% \pm 0,57	561 2,13% \pm 0,75	562 0%	563 6,42% \pm 0,54	800 (RD)		Sin tratamiento 0%	800 (RD) 47,53% \pm 2,05
				No cuantificado	0%		



FIG. 5J

Oligos del escaneo del exón 45 de la distrofina

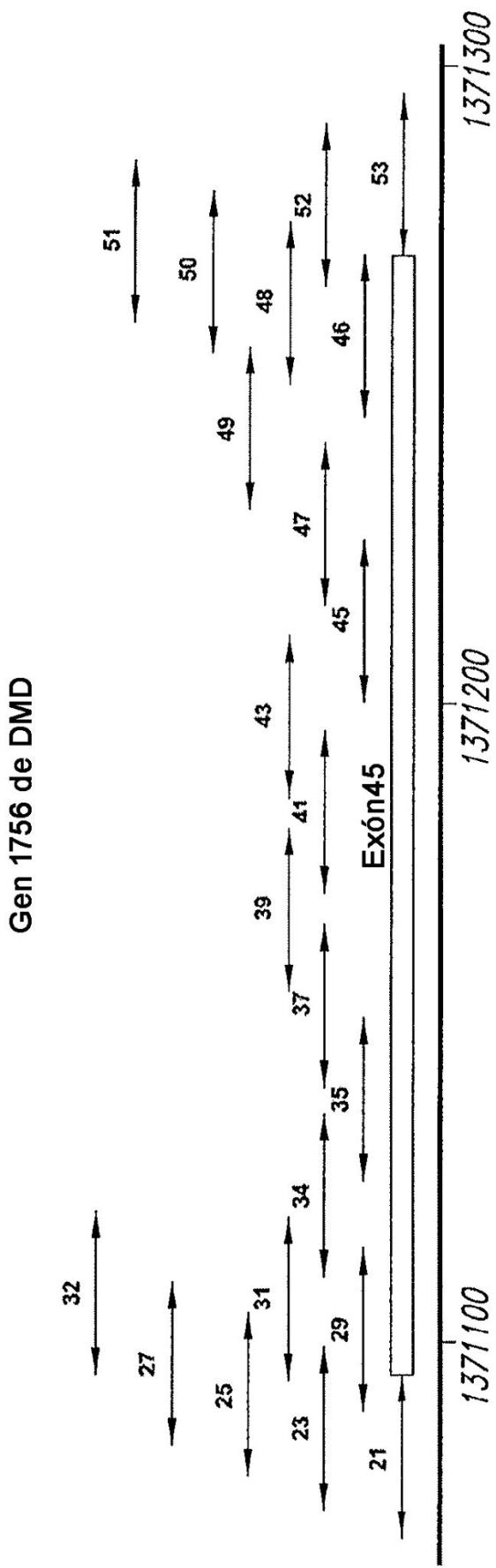


FIG. 6A

Oligos seleccionados del exón 45 de la distrofina

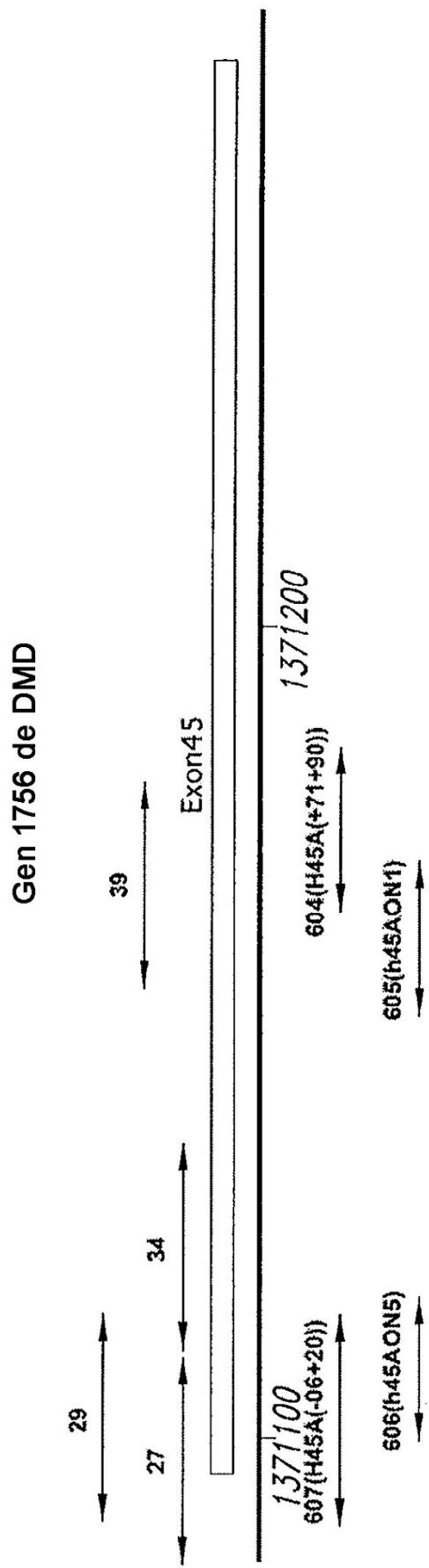


FIG. 6B

Exón 45 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0770 09AU11-J(F2)(SEC ID nº 27)

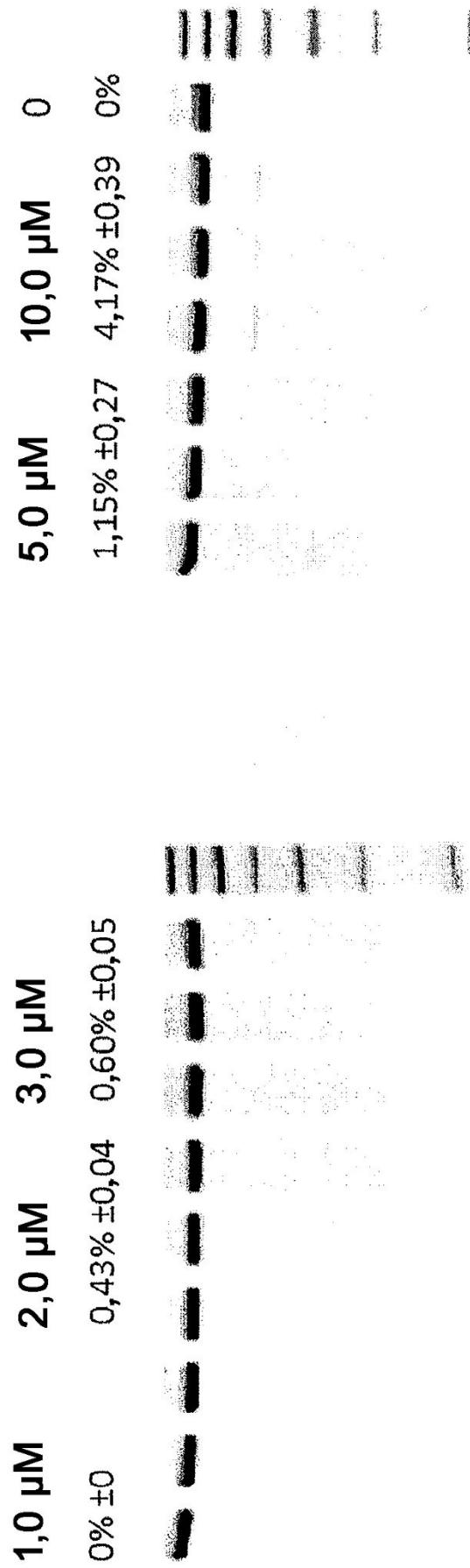


FIG. 6C

Exón 45 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0771 09AU11-J(A4) (SEC ID nº 29)

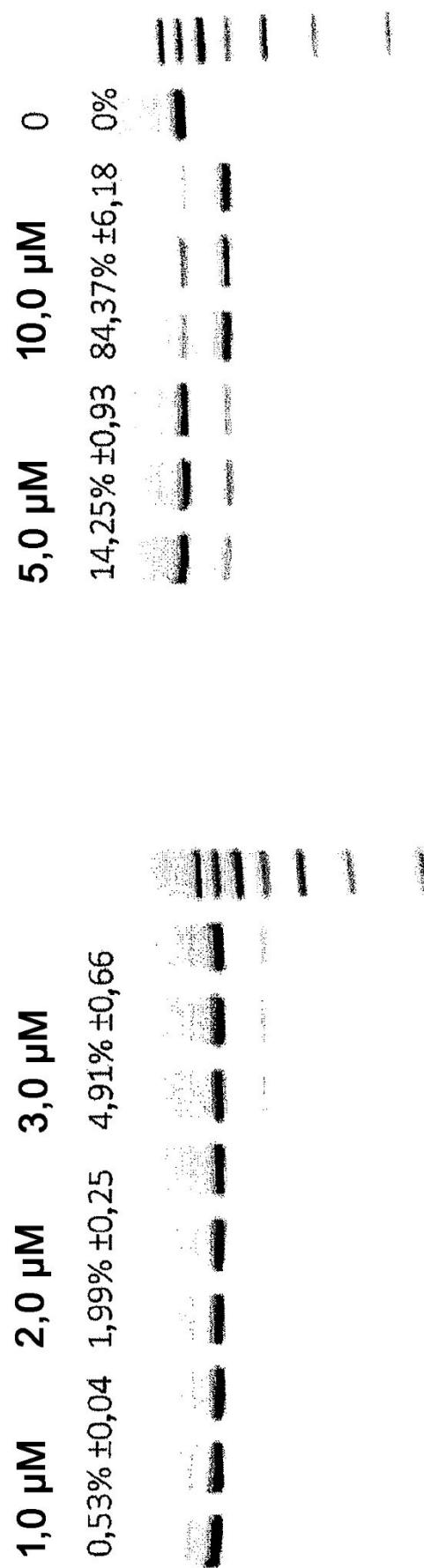


FIG. 6D

Exón 45 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0774 09AU11-J(B4) (SEC ID nº 34)

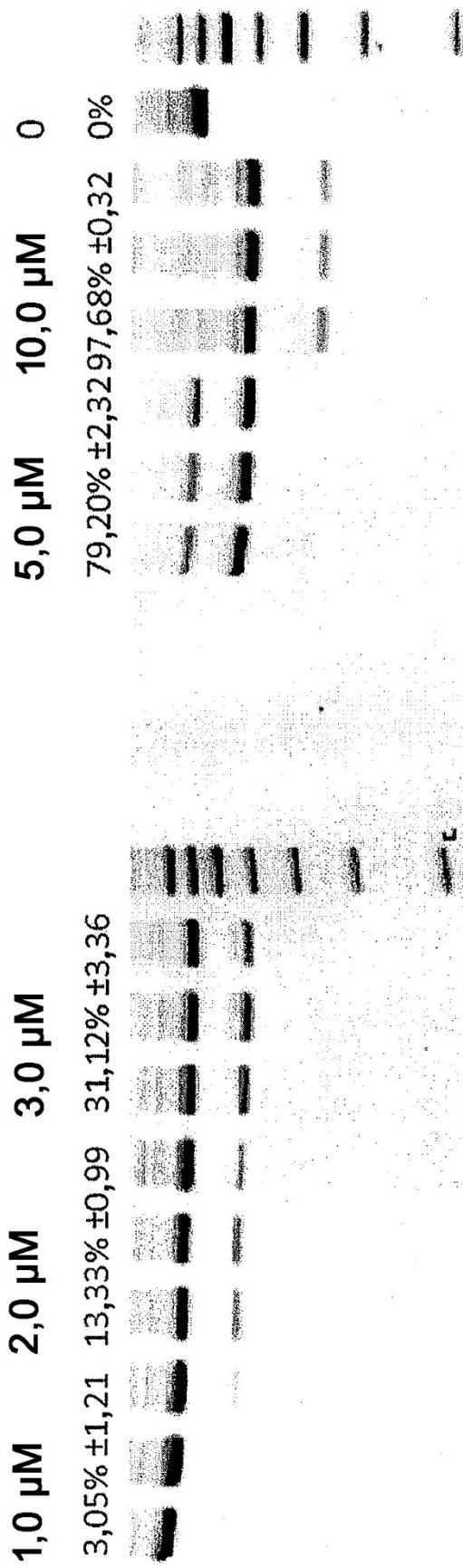


FIG. 6E

Exón 45 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

NG-0777 09AU11-J(C4) (SEC ID nº 39)

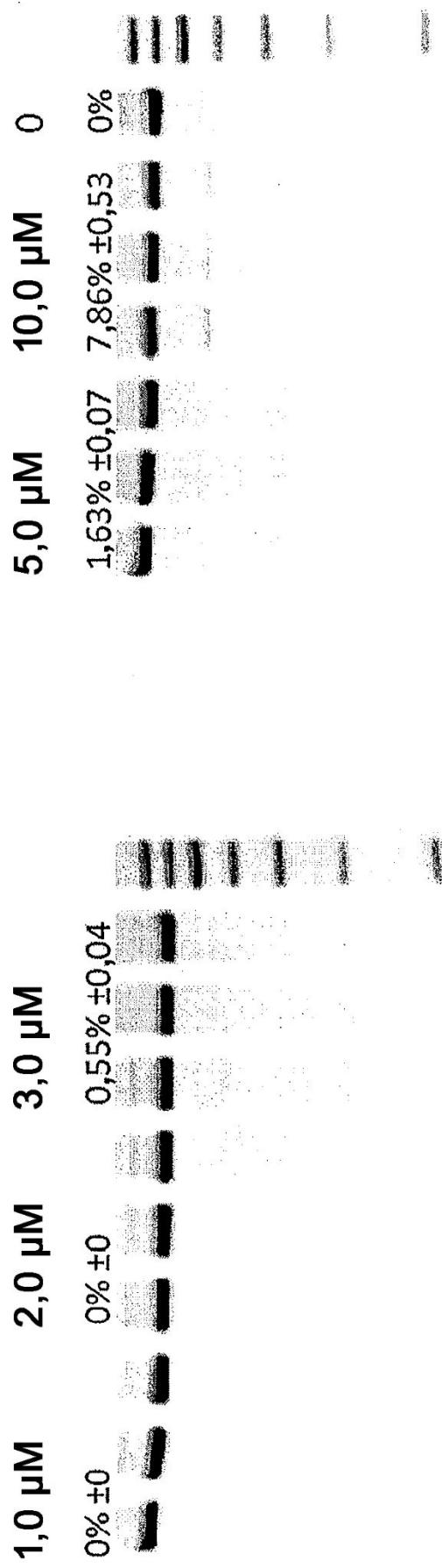


FIG. 6F

Exón 45 DR.2

Síntesis de alta pureza (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 μM) Células RD

(Control negativo)

NG-0782 09AUI1-J(D4) (SEC ID nº 49)

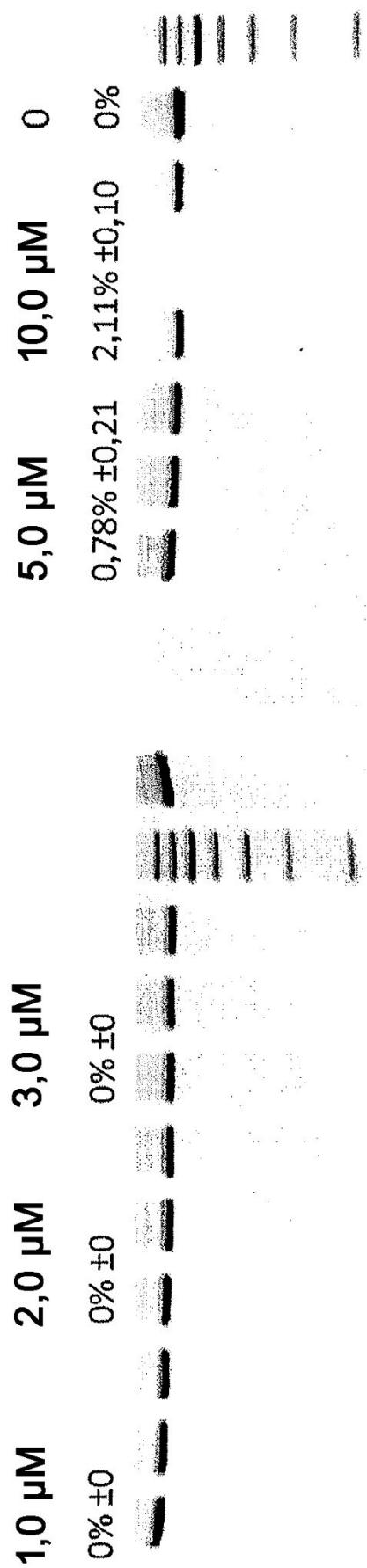


FIG. 6G

Resumen de rangos de dosis de exón 45 en células RD

Porcentaje con omisión exónica

Tratamiento (μ M)	770 (SEC ID nº 27)	771 (SEC ID nº 29)	774 (SEC ID nº 34)	777 (SEC ID nº 39)	782 (SEC ID nº 49)
1,0	0,00	0,53	3,05	0,00	0,00
2,0	0,43	1,99	13,33	0,00	0,00
3,0	0,60	4,91	31,12	0,55	0,00
5,0	1,15	14,25	79,20	1,63	0,78
10	4,17	84,37	97,68	7,86	2,11
EC ₅₀ (μ M)	54,37	7,25	3,69	NA	NA

FIG. 6H

Exón 45 CS (Cribado de competidores)

Síntesis de alta pureza, 3,0 µM, Células RD

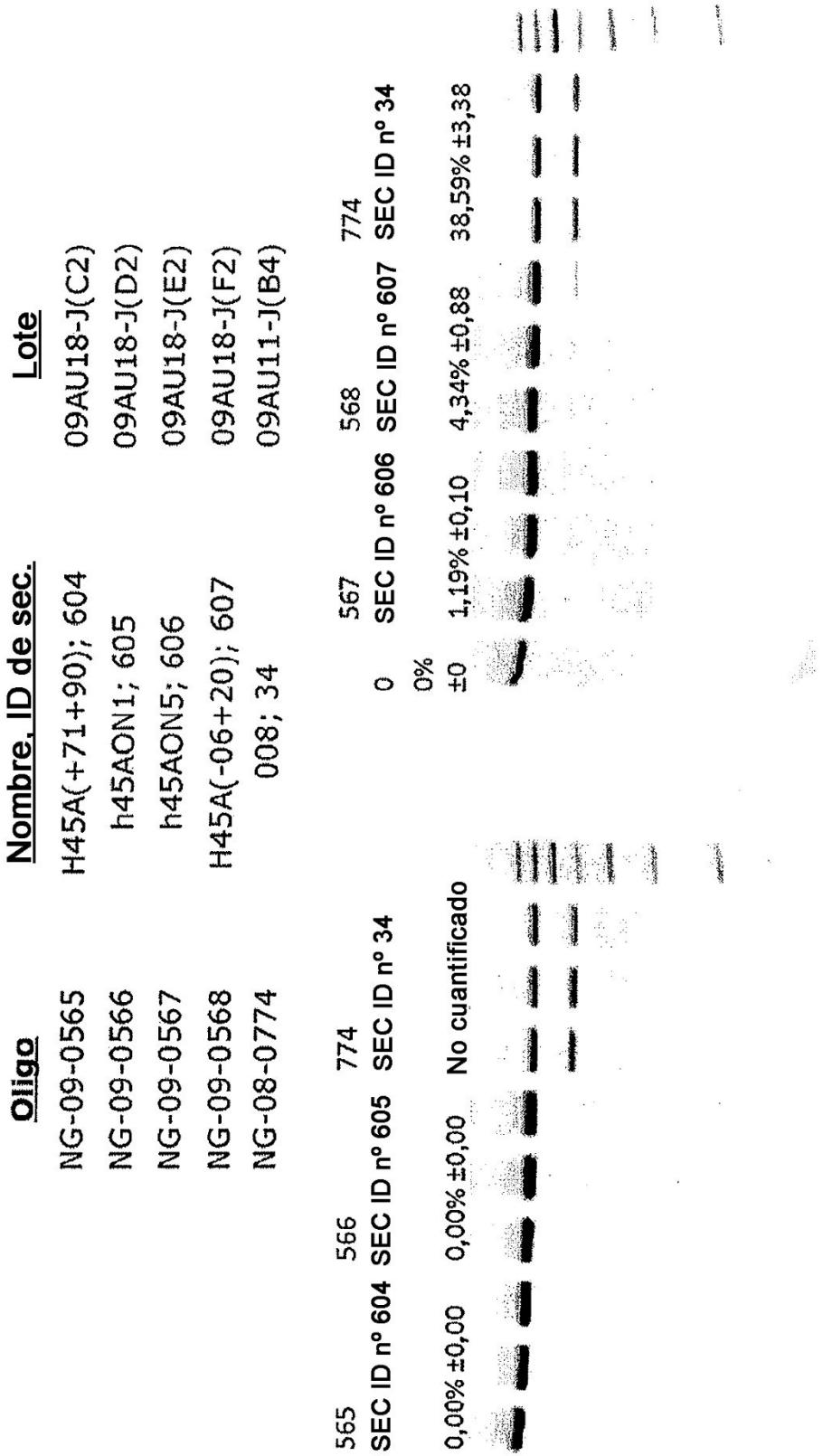


FIG. 6I

Exón 45 MCS (Cribado de competidores en células musculares)
Síntesis de alta pureza, 3,0 µM, Células primarias de músculo esquelético humano

Oligo	Nombre ID de sec.	Lote
NG-09-0565	H45A(+71+90); 604	09AU18-J(C2)
NG-09-0566	h45ACON1; 605	09AU18-J(D2)
NG-09-0567	h45ACON5; 606	09AU18-J(E2)
NG-09-0568	H45A(-06+20); 607	09AU18-J(F2)
NG-08-0774	008; 34	09AU11-J(B4)
774	565	566
SEC ID nº	SEC ID nº	SEC ID nº
34	604	605
0%	0%	0%
774	567	568
SEC ID nº	SEC ID nº	SEC ID nº
34	606	607
0%	0%	0%
774 (RD)	774 (RD)	774 (RD)
tr.	tr.	tr.
38,59%	38,59%	38,59%
±3,38	±3,38	±3,38

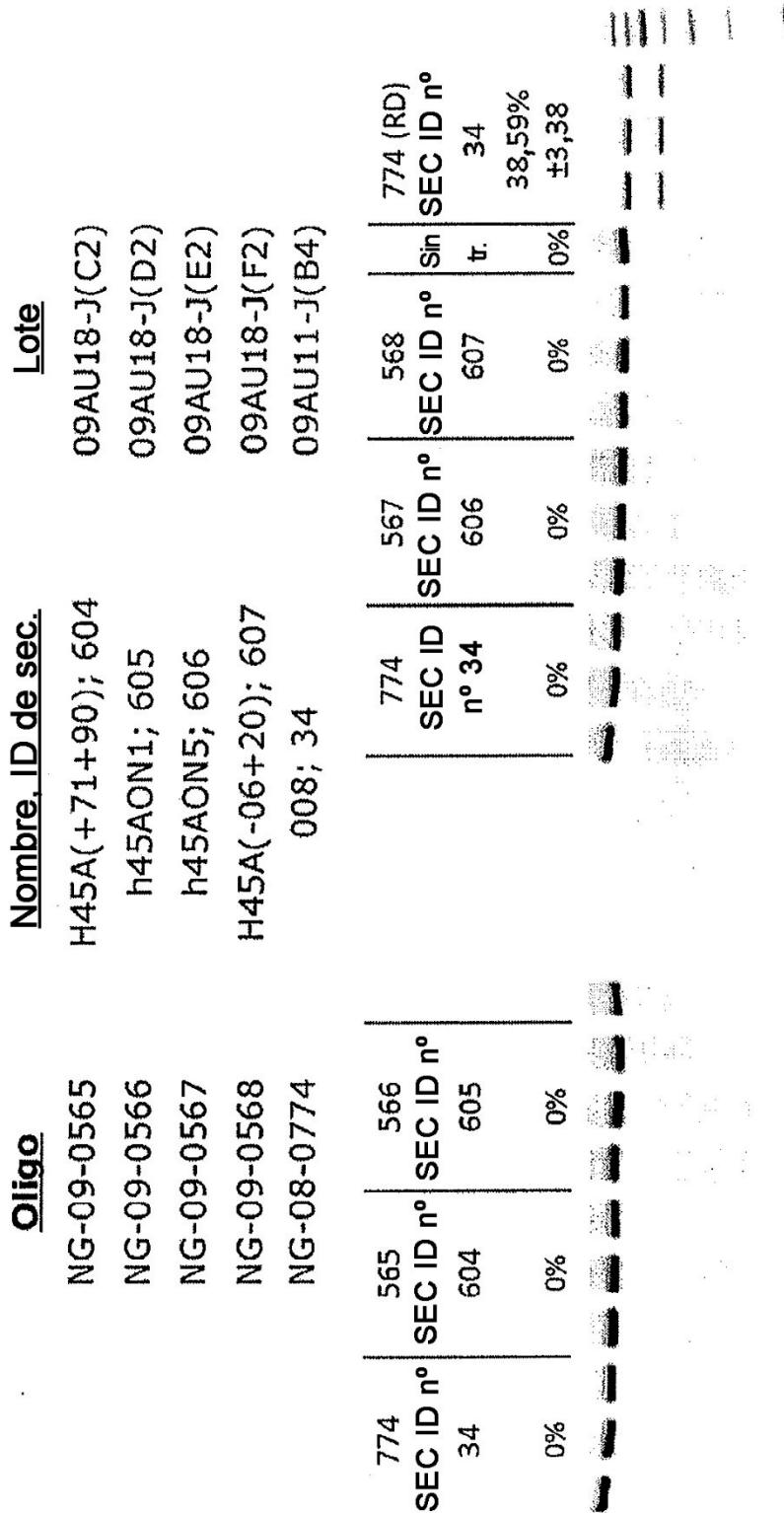


FIG. 6J