



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(21) BR 112019012664-3 A2**



\* B R 1 1 2 0 1 9 0 1 2 6 6 4 A 2 \*

**(22) Data do Depósito: 14/12/2017**

**(43) Data da Publicação Nacional: 21/01/2020**

---

**(54) Título:** CONJUGADOS DE OLIGÔMERO DE SALTO DE ÉXON PARA DISTROFIA MUSCULAR

**(51) Int. Cl.:** A61K 47/64; A61P 21/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 06/01/2017 US 62/443,484; 19/12/2016 US 62/436,223; 22/09/2017 US 62/562,146; 30/03/2017 US 62/479,178.

**(71) Depositante(es):** SAREPTA THERAPEUTICS, INC..

**(72) Inventor(es):** MARCO A. PASSINI; GUNNAR J. HANSON.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2017066509 de 14/12/2017

**(87) Publicação PCT:** WO 2018/118662 de 28/06/2018

**(85) Data da Fase Nacional:** 18/06/2019

**(57) Resumo:** Trata-se de conjugados de oligômero antisenseno complementares a um sítio alvo selecionado no gene da distrofia humana para induzir salto de éxon 53.



**"CONJUGADOS DE OLIGÔMERO DE SALTO DE ÉXON PARA DISTROFIA MUSCULAR"**

**Informações Relacionadas**

[001]Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº 62/436223, depositado em 19 de dezembro de 2016, Pedido de Patente Provisório de Nº de Série 62/443484, depositado em 6 de janeiro de 2017, Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/479178, depositado em 30 de março de 2017, e Pedido de Patente Provisório nº U.S. 62/562146, depositado em 22 de setembro de 2017. Todo o conteúdo dos pedidos de patente provisórios referenciados acima é incorporado no presente documento a título de referência.

**Campo da Divulgação**

[002]A presente divulgação refere-se a conjugados de oligômero antissenso inovadores adequados para salto de éxon 53 no gene da distrofia humana e composições farmacêuticas dos mesmos. A divulgação também fornece métodos para induzir salto de éxon 53 com o uso dos conjugados de oligômero antissenso inovadores, métodos para produzir distrofina em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, e métodos para tratar um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53.

**Antecedentes da Divulgação**

[003]As tecnologias antissenso estão em desenvolvimento com o uso de uma faixa de produtos químicos para afetar a expressão de gene em uma variedade de níveis diferentes (transcrição, splicing, estabilidade, tradução). Grande parte dessa pesquisa focou no uso de compostos antissenso para corrigir ou compensar genes associados a doença ou anormais em uma ampla faixa de indicações. As moléculas antissenso podem inibir a expressão de gene com especificidade, e por conta disso, muitos esforços de pesquisa em relação a oligômeros como moduladores de expres-

são de gene focaram na inibição da expressão de genes alvo ou a função de elementos de atuação cis. Os oligômeros antissenso são tipicamente direcionados contra RNA, a fita senso (por exemplo, mRNA), ou fita menos no caso de alguns alvos de RNA viral. Para alcançar um efeito desejável de regulação decrescente de gene específico, os oligômeros promovem geralmente o decaimento do mRNA alvo, bloqueiam a tradução do mRNA ou bloqueiam a função de elementos de RNA de atuação cis, assim prevenindo de modo eficaz a síntese *de novo* da proteína alvo ou replicação do RNA viral.

[004]Entretanto, tais técnicas não são úteis quando o objetivo é regular de modo crescente a produção da proteína nativa ou compensar por mutações que induzem à terminação prematura de tradução, como mutações sem sentido ou mutações de deslocamento de quadro. Nestes casos, a transcrição de gene defeituosa não deve ser submetida à degradação alvo ou inibição estérica, então, a química de oligômero antissenso não deve promover o decaimento de mRNA alvo ou bloquear a tradução.

[005]Em uma variedade de doenças genéticas, os efeitos de mutações na expressão eventual de um podem ser modulados através de um processo de salto de éxon alvo durante o processo de splicing. O processo de splicing é direcionado por maquinaria de múltiplos componentes complexa que traz junções éxon-ítron adjacentes em pré-mRNA em proximidade e realiza a clivagem de ligações fosfodiéster nas extremidades dos íntrons com sua reformação subsequente entre éxons que deverão ser submetidos a splicing juntos. Esse processo complexo e altamente preciso é mediado por motivos de sequência no pré-mRNA que são segmentos de RNA semiconservados relativamente curtos aos quais vários fatores de splicing nucleares que são, então, envolvidos nas reações de splicing se ligam. Mudando-se a maneira que a maquinaria de splicing lê ou reconhece os motivos envolvidos em pré-processamento de mRNA, é possível criar moléculas de mRNA submetidas a splicing de modo

diferencial. Foi reconhecido agora que a maior parte dos genes humanos são alternativamente submetidos a splicing durante a expressão de gene normal, embora os mecanismos envolvidos não tenham sido identificados. Bennett *et al.* (A Patente nº U.S. 6.210.892) descreve a modulação antissenso de processamento de mRNA celular do tipo selvagem com o uso de análogos de oligômero antissenso que não induzem clivagem mediada por RNase H do RNA alvo. Isso tem uso em poder gerar mRNAs alternativamente submetidos a splicing que não têm exons específicos (consultar, por exemplo, conforme descrito por Sazani, Kole, et al. 2007 para a geração de receptores de superfamília de TNF solúveis que não têm exons que codificam domínios de abrangência de membrana).

[006]Em casos em que uma proteína normalmente funcional é prematuramente terminada devido às mutações na mesma, um meio para restaurar alguma produção de proteína funcional através da tecnologia antissenso demonstrou ser possível através da intervenção durante os processos de splicing, e que se exons associados a mutações que causam doenças podem ser especificamente deletados de alguns genes, um produto de proteína encurtada pode ser algumas vezes produzido, o qual tem propriedades biológicas similares da proteína nativa ou tem atividade biológica para amenizar a doença causada por mutações associadas ao exon (consulte, por exemplo, Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004). Kole *et al.* (Patentes nº U.S.: 5.627.274; 5.916.808; 5.976.879; e 5.665.593) divulgam métodos para combater splicing aberrante com o uso de análogos de oligômero antissenso modificados que não promovem o decaimento do pré-mRNA alvo. Bennett *et al.* (A Patente nº U.S. 6.210.892) descreve a modulação antissenso de processamento de mRNA celular do tipo selvagem também com o uso de análogos de oligômero antissenso que não induzem clivagem mediada por RNase H do RNA alvo.

[007]O processo de salto de exon alvo é propenso a ser particularmente útil

em genes longos em que há muitos éxons e íntrons, em que há redundância na constituição genética dos éxons ou em que uma proteína pode funcionar sem um ou mais éxons particulares. Os esforços para redirecionar o processamento de gene para o tratamento de doenças genéticas associadas a truncamentos causados por mutações em vários genes focaram no uso de oligômeros antissenso que: (1) sobrepõem completa ou parcialmente os elementos envolvidos no processo de splicing; ou (2) se ligam ao pré-mRNA em uma posição suficientemente próxima ao elemento para romper a ligação e a função de fatores de splicing que mediariam normalmente uma reação de splicing particular que ocorre naquele elemento.

[008]A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é causada por um defeito na expressão da proteína de distrofina. O gene que codifica a proteína contém 79 éxons espalhados por mais do que 2 milhões de nucleotídeos de DNA. Qualquer mutação exônica que muda o quadro de leitura do éxon, ou introduz um códon de parada, ou é **CARACTERIZADA** pela remoção de um inteiro de éxon ou éxons de quadro, ou duplicações de um ou mais éxons, tem o potencial para perturbar a produção de distrofina funcional, resultando em DMD.

[009]A forma menos severa de distrofia muscular, distrofia muscular de Becker (BMD) foi constatada como surgindo onde uma mutação, tipicamente uma deleção de um ou mais éxons, resulta em um quadro de leitura correto ao longo da transcrição de distrofina inteira, de modo que a tradução de mRNA em proteína não seja prematuramente terminada. Se a união dos éxons a montante e a jusante no processamento de um pré-mRNA de distrofina que sofreu mutação mantém o quadro de leitura correto do gene, o resultado é um mRNA que codifica uma proteína com uma deleção interna curta que retém alguma atividade, resultando em fenótipo de Becker.

[010]Se soube por muitos anos que as deleções de um éxon ou éxons que não alteram o quadro de leitura de uma proteína de distrofina gerariam um fenótipo

de BMD, enquanto uma deleção de éxon que causa um deslocamento de quadro gerará DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). Em geral, as mutações de distrofina incluindo mutações de ponto e deleções de éxon que mudam o quadro de leitura e interrompem, desse modo, a tradução de proteína resultariam em DMD. Também deve ser notado que alguns pacientes com BMD e DMD têm deleções de éxon que cobrem múltiplos éxons.

[011]A modulação de splicing de pré-mRNA de distrofina mutante com oligoribonucleotídeos antissenso foi relatada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (see e.g., Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Wilton, Lloyd et al. 1999; Mann, Honeyman et al. 2002; Errington, Mann et al. 2003).

[012]Os oligômeros antissenso foram especificamente projetados para alvejar regiões específicas do pré-mRNA, tipicamente éxons para induzir ao salto de uma mutação do gene de DMD assim restaurando essas mutações foram de quadro em quadro para possibilitar a produção proteína de distrofina funcional internamente encurtada. Tais oligômeros antissenso foram conhecidos por alvejar completamente no éxon (chamadas sequências internas de éxon) ou em um doador de splicing ou junção aceitante de splicing que cruza a partir do éxon para uma porção do íntron.

[013]A constatação e o desenvolvimento de tais oligômeros antissenso para DMD foi uma área de pesquisa anterior. Estes desenvolvimentos incluem aqueles de: (1) a University of Western Australia e Sarepta Therapeutics (requerente deste pedido): documentos nº WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Proensa Technologies (agora BioMarin Pharmaceutical): documentos nº WO 02/24906; WO 2004/083432; WO 2004/083446; WO 2006/112705; WO 2007/133105; WO 2009/139630; WO 2009/054725; WO 2010/050801; WO 2010/050802; WO

2010/123369; WO 2013/112053; WO 2014/007620; (3) Carolinas Medical Center: documento nº WO 2012/109296; (4) Royal Holloway: patentes e pedidos que reivindicam o benefício de, e incluindo, números de série U.S. 61/096.073 e 61/164.978; como US 8.084.601 e nº US 2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals e Matsuo: U.S. 6.653.466; patentes e pedidos que reivindicam o benefício de, e incluindo, JP 2000-125448, como US 6.653.467; patentes e pedidos que reivindicam o benefício de, e incluindo, JP 2000-256547, como documentos nº US 6.727.355; WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: documentos nº WO 2012/029986; WO 2013/100190; WO 2015/137409; WO 2015/194520; e (6) Association Institut de Myologie/Universite Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthena AG: documentos nº WO 2010/115993; WO 2013/053928.

[014] A constatação e o desenvolvimento de oligômeros antissenso conjugados com peptídeos de penetração de célula para DMD também foi uma área de pesquisa (consultar a Publicação nº PCT WO 2010/048586; Wu, B. et al., *The American Journal of Pathology*, Volume 181 (2): 392 a 400, 2012; Wu, R. et al., *Nucleic Acids Research*, Volume 35 (15): 5.182 a 5.191, 2007; Mulders, S. et al., *19<sup>th</sup> International Congress of the World Muscle Society*, Poster Presentation Berlin, outubro de 2014; Bestas, B. et al., *The Journal of Clinical Investigation*, doi: 10.1172/JCI76175, 2014; Jearawiriyapaisarn, N. et al., *Molecular Therapy*, Volume 16(9): 1.624 a 1.629, 2008; Jearawiriyapaisarn, N. et al., *Cardiovascular Research*, Volume 85: 444 a 453, 2010; Moulton, H.M. et al., *Biochemical Society Transactions*, Volume 35 (4): 826 a 828, 2007; Yin, H. et al., *Molecular Therapy*, Volume 19 (7): 1.295 a 1.303, 2011; Abes, R. et al., *J. Pept. Sci.*, Volume 14: 455 a 460, 2008; Lebleu, B. et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 60: 517 a 529, 2008; McClorey, G. et al., *Gene Therapy*, Volume 13: 1.373 a 1.381, 2006 ; Alter, J. et al., *Nature Medicine*, Volume 12 (2): 175 a 177, 2006; e Youngblood, D. et al., *American Chemical Society*, Bioconjugate Chem., 2007, 18 (1), páginas 50 a 60).

[015]Os peptídeos de penetração de célula (CPP), por exemplo, uma porção química de transporte de peptídeo rico em arginina, pode ser eficaz para intensificar a penetração de, por exemplo, um oligômero antissenso conjugado com o CPP, em uma célula.

[016]Apesar desses esforços, ainda há uma necessidade por oligômeros antissenso melhorados que alvejem éxon 53 e composições farmacêuticas correspondentes que sejam potencialmente úteis para métodos terapêuticos para produzir distrofina e tratar DMD.

#### Sumário da Divulgação

[017]Os conjugados de oligômero antissenso fornecidos no presente documento incluem uma porção química de oligômero antissenso conjugada com um CPP. Em um aspecto, a divulgação fornece conjugados de oligômero antissenso que compreendem:

[018]um oligômero antissenso de 25 subunidades em comprimento com capacidade para ligar um alvo selecionado para induzir salto de éxon no gene da distrofia humana, em que o oligômero antissenso compreende uma sequência de bases que é complementar a uma região alvo de éxon 53 do pré-mRNA de distrofina designada como um sítio de anelamento; e

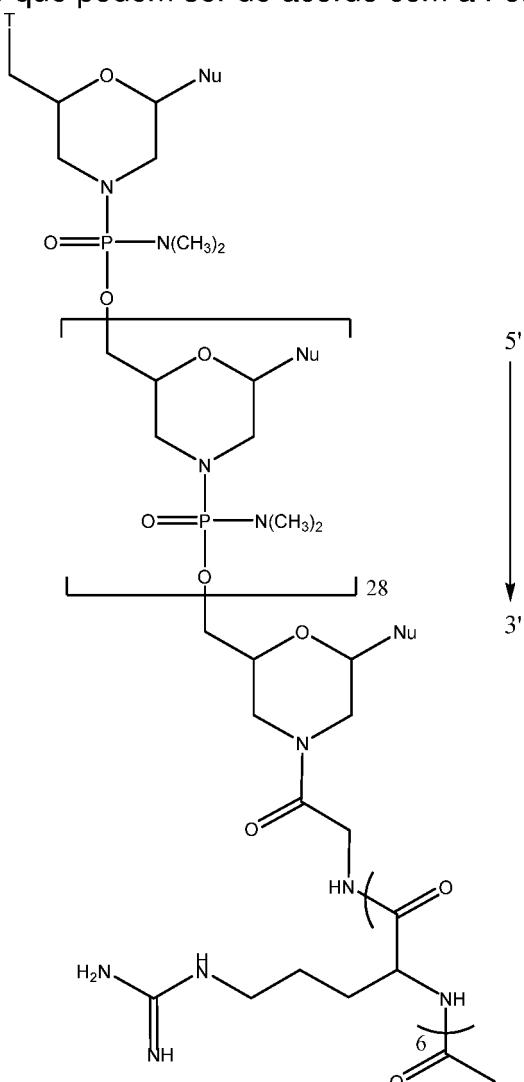
[019]um peptídeo de penetração de célula (CPP) conjugado com o oligômero antissenso por uma porção química ligante.

[020]Em algumas modalidades, o sítio de anelamento é H53A(+36+60).

[021]Em algumas modalidades, as bases do oligômero antissenso são ligadas a estruturas de anel de morfolino, em que as estruturas de anel de morfolino são unidas por ligações intersubunidade que contêm fósforo que une um nitrogênio de morfolino de uma estrutura de anel a um carbono exocíclico 5' de uma estrutura de anel adjacente. Em certas modalidades, o peptídeo de penetração de célula tem seis uni-

dades de arginina ("R<sub>6</sub>") e a porção química ligante é uma glicina. Em algumas modalidades, o oligômero antissenso compreende uma sequência de bases designada como a SEQ ID NO: 1.

[022]Em vários aspectos, a divulgação fornece conjugados de oligômero antissenso que podem ser de acordo com a Fórmula (I):

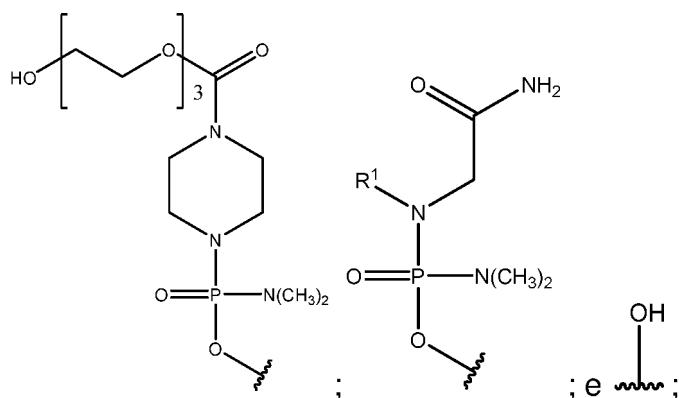


(I)

[023]ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

[024]cada Nu é uma nucleobase que tomada em conjunto forma uma sequência alvo; e

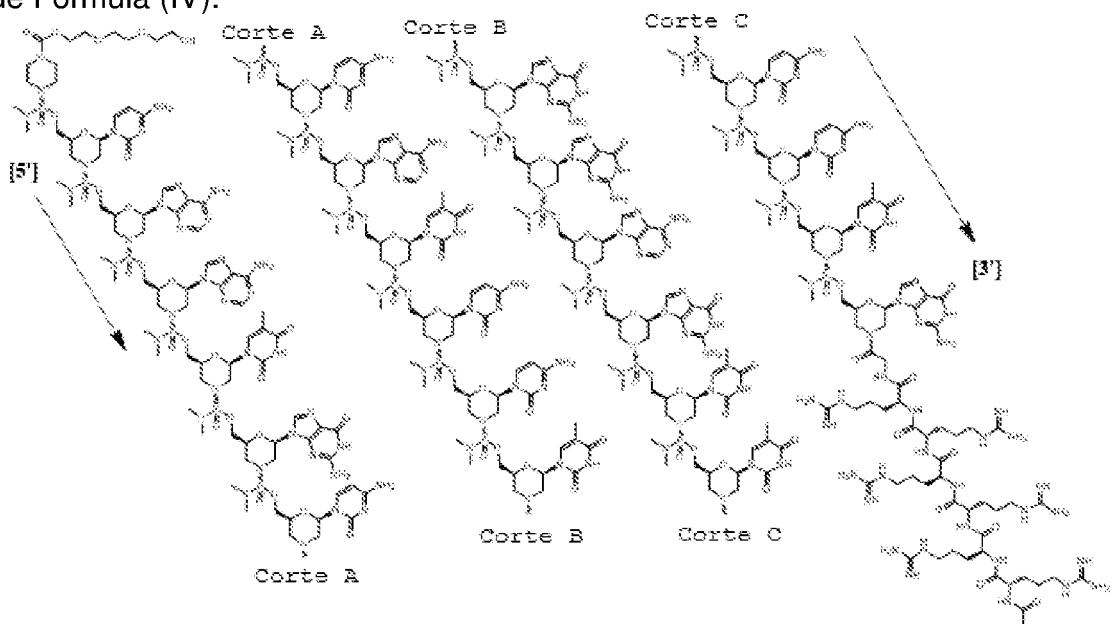
[025]T é uma porção química selecionada de:



[026]R<sup>1</sup> é C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila;

[027]em que a sequência alvo é complementar a um sítio de anelamento de exón 53 no pré-mRNA de distrofina designado como H53A(+36+60).

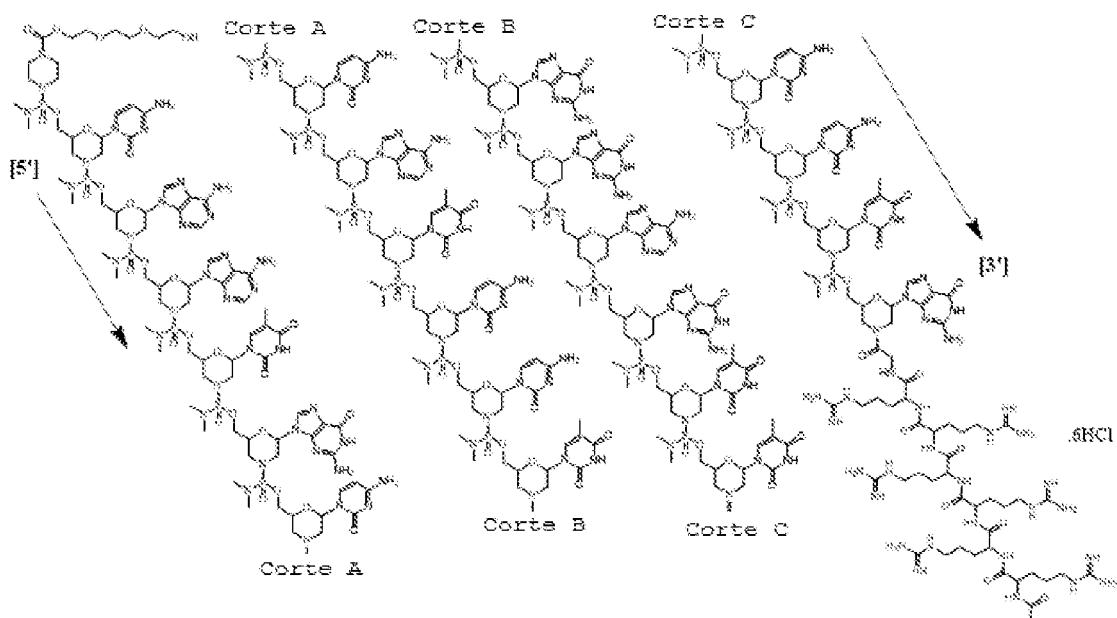
[028]Em outro aspecto, a divulgação fornece conjugados de oligômero antisenso de Fórmula (IV):



(IV)

[029]ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[030]Em outro aspecto, a divulgação fornece conjugados de oligômero antisenso de Fórmula (IVA):



(IVA).

[031] Em outro aspecto, a divulgação fornece composições farmacêuticas que incluem os conjugados de oligômero antissenso da divulgação, e um carreador farmacêuticamente aceitável. Em algumas modalidades, o carreador farmacêuticamente aceitável é uma solução salina que inclui um tampão fosfato.

[032] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para tratar distrofia muscular de Duchenne (DMD) em um indivíduo que necessita do mesmo, em que o indivíduo tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, em que o método compreende administrar ao indivíduo um conjugado de oligômero antissenso da divulgação. A divulgação também aborda o uso de conjugados de oligômero antissenso da divulgação, para a fabricação de um medicamento para tratamento de distrofia muscular de Duchenne (DMD) em um indivíduo que necessita do mesmo, em que o indivíduo tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53.

[033] Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para restaurar um quadro de leitura de mRNA para induzir a produção de distrofina em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, em que o método compreende administrar ao indivíduo um conjugado de oligômero antissenso

da divulgação. Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para excluir o éxon 53 de pré-mRNA de distrofina durante o processamento de mRNA em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, em que o método compreende administrar ao indivíduo um conjugado de oligômero antissenso da divulgação. Em outro aspecto, a divulgação fornece um método para ligar o éxon 53 de pré-mRNA de distrofina em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, em que o método compreende administrar ao indivíduo um conjugado de oligômero antissenso da divulgação.

[034]Em outro aspecto, a divulgação fornece um conjugado de oligômero antissenso da divulgação no presente documento para uso em terapia. Em certas modalidades, a divulgação fornece um conjugado de oligômero antissenso da divulgação para uso no tratamento de distrofia muscular de Duchenne. Em certas modalidades, a divulgação fornece um conjugado de oligômero antissenso da divulgação para uso na fabricação de um medicamento para uso em terapia. Em certas modalidades, a divulgação fornece um conjugado de oligômero antissenso da divulgação para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de distrofia muscular de Duchenne.

[035]Em outro aspecto, a divulgação também fornece kits para tratar distrofia muscular de Duchenne (DMD) em um indivíduo que necessita do mesmo, em que o indivíduo tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, cujos kits compreendem pelo menos um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação, empacotado em um recipiente adequado e instruções para seu uso.

[036]Estes e outros objetos e recursos serão mais completamente entendidos quando a descrição detalhada a seguir da divulgação for lida em combinação com as figuras.

#### Breve Descrição das Figuras

[037]A Figura 1 representa uma seção de pré-mRNA de distrofina normal e mRNA maduro.

[038]A Figura 2 representa uma seção de pré-mRNA de distrofina anormal (exemplo de DMD) e distrofina instável não funcional resultante.

[039]A Figura 3 representa eteplirsen, projetado para saltar o éxon 51, restauração de leitura “em quadro” de pré-mRNA.

[040]A Figura 4 fornece um gráfico de barras da porcentagem de salto de éxon 53 em mioblastos humanos saudáveis por PMO n º1 e PPMO n º1 em várias concentrações 96 horas após o tratamento, conforme medido por RT-PCR. Barras de erros representam média ± SD.

[041]As Figuras 5A a 5D fornecem imagens representativas de análise de Western Blot que mede a proteína de distrofina no quadríceps de camundongos mdx tratados com PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) por pontos no tempo diferentes [7 dias (5A), 30 dias (5B), 60 dias (5C), e 90 dias (5D)].

[042]A Figura 6A fornece um gráfico de linhas que representa a porcentagem de distrofina de tipo selvagem induzida por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no quadríceps de camundongos mdx por 90 dias pós-injeção, conforme determinado por análise Western Blot.

[043]A Figura 6B fornece um gráfico de linhas que representa a porcentagem de salto de éxon 23 induzido por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no quadríceps de camundongos mdx por 90 dias pós-injeção, conforme determinado por RT-PCR.

[044]As Figuras 7A a 7D fornecem imagens representativas de análise de Western Blot que mede a proteína de distrofina no diafragma de camundongos mdx tratados com PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) por pontos no tempo diferentes [7 dias (5A), 30 dias (7B), 60 dias (7C), e 90 dias (5D)].

[045]A Figura 8A fornece um gráfico de linhas que representa a porcentagem de distrofina de tipo selvagem induzida por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no diafragma de camundongos mdx por 90 dias pós-injeção, conforme determinado

por análise Western Blot.

[046]A Figura 8B fornece um gráfico de linhas que representa a porcentagem de salto de éxon 23 induzido por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no diafragma de camundongos mdx por 90 dias pós-injeção, conforme determinado por RT-PCR.

[047]As Figuras 9A a 9D fornecem imagens representativas de análise de Western Blot que mede a proteína de distrofina no coração de camundongos mdx tratados com PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) por pontos no tempo diferentes [7 dias (9A), 30 dias (9B), 60 dias (9C), e 90 dias (9D)].

[048]A Figura 10A fornece um gráfico de linhas que representa a porcentagem de distrofina de tipo selvagem induzida por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no coração de camundongos mdx por 90 dias pós-injeção, conforme determinado por análise Western Blot.

[049]A Figura 10B fornece um gráfico de linhas que representa a porcentagem de salto de éxon 23 induzido por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no coração de camundongos mdx por 90 dias pós-injeção, conforme determinado por RT-PCR.

[050]A Figura 11 fornece análise de imuno-histoquímica que mostra distrofina em quadríceps esquerdo de camundongo mdx induzida por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225).

[051]As Figuras 12A a 12B fornecem imagens representativas de análise Western Blot que mede a proteína de distrofina no coração de camundongos mdx tratados com PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) para doses diferentes: 40 mg/kg, 80 mg/kg, e 120 mg/kg.

[052]A Figura 13 fornece um gráfico de barras que representa a porcentagem de distrofina de tipo selvagem induzida por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no coração de camundongos mdx conforme determinado por análise Western Blot 30 dias pós-injeção em doses diferentes: 40 mg/kg, 80 mg/kg, e 120 mg/kg.

[053]As Figuras 14A a 14B fornecem imagens representativas de análise Western Blot que mede a proteína de distrofina no diafragma de camundongos mdx tratados com PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) para doses diferentes de 40 mg/kg, 80 mg/kg, e 120 mg/kg.

[054]A Figura 15 fornece um gráfico de barras que representa a porcentagem de distrofina de tipo selvagem induzida por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no diafragma de camundongos mdx conforme determinado por análise Western Blot 30 dias pós-injeção em doses diferentes: 40 mg/kg, 80 mg/kg, e 120 mg/kg.

[055]As Figuras 16A a 16B fornecem imagens representativas de análise Western Blot que mede a proteína de distrofina no quadríceps de camundongos mdx tratados com PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) em doses diferentes: 40 mg/kg, 80 mg/kg, e 120 mg/kg.

[056]A Figura 17 fornece um gráfico de barras que representa a porcentagem de distrofina de tipo selvagem induzida por PMO (PMO4225) ou PPMO (PPMO4225) no quadríceps de camundongos mdx conforme determinado por análise Western Blot 30 dias pós-injeção em doses diferentes: 40 mg/kg, 80 mg/kg, e 120 mg/kg.

[057]A Figura 18 mostra os ciclos de acoplamento realizados por Método de Síntese de PMO B.

[058]A Figura 19 fornece a análise de imuno-histoquímica que mostra a distrofina e laminina em diafragma e coração de camundongo mdx induzida por PPMO (PPMO4225) em comparação com a solução salina em camundongos mdx e camundongos do tipo selvagem.

[059]A Figura 20 fornece um gráfico de barras da porcentagem de salto de éxon 53 em miotubos humanos saudáveis por PMO nº 1 e PPMO nº 1 em várias concentrações 96 horas após o tratamento, conforme medido por RT-PCR. As barras de erro representam média ± SD.

#### Descrição Detalhada da Divulgação

[060]As modalidades da presente divulgação se referem geralmente a conjugados de oligômero antissenso melhorados, e métodos de uso dos mesmos, os quais são especificamente projetados para induzir salto de éxon no gene da distrofia humana. A distrofia tem uma função vital na função muscular, e várias doenças relacionadas ao músculo são caracterizadas por formas que sofreram mutação desse gene. Então, em certas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso melhorados descritos no presente documento induzem salto de éxon em formas que sofreram mutação do gene da distrofia humana, como os genes de distrofina que sofreram mutação encontrados em distrofia muscular de Duchenne (DMD) e distrofia muscular de Becker (BMD).

[061]Devido a eventos de splicing de mRNA aberrantes causados por mutações, esses genes de distrofina humana que sofreram mutação expressam proteína de distrofina defeituosa ou não expressam distrofina mensurável, uma afecção que leva a várias formas de distrofia muscular. Para remediar esta afecção, os conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação hibridizam a regiões selecionadas de um mRNA pré-processado de um gene da distrofia humana que sofreu mutação, induzem salto de éxon e splicing diferencial no mRNA de distrofina submetido a splicing aberrante de outro modo, e assim permitem que células musculares produzam uma transcrição de mRNA que codifica uma proteína de distrofina funcional. Em certas modalidades, a proteína de distrofina resultante não é necessariamente a forma do “tipo selvagem” de distrofina, mas em vez disso, é uma forma truncada, ainda funcional, de distrofina.

[062]Aumentando-se os níveis de proteína de distrofina funcional em células musculares, essas modalidades relacionadas são úteis na profilaxia e no tratamento de distrofia muscular, especialmente aquelas formas de distrofia muscular, como DMD e BMD, que são caracterizadas pela expressão de proteínas de distrofina defeituosas

devido ao splicing de mRNA. Os conjugados de oligômero antissenso específicos descritos no presente documento fornecem adicionalmente o alvejamento específico de distrofina-éxon melhorado sobre outros oligômeros, e assim oferecem vantagens significantes e práticas sobre métodos alternativas para tratar formas relevantes de distrofia muscular.

[063]Desse modo, a divulgação se refere a conjugados de oligômero antissenso que compreendem:

[064]um oligômero antissenso de 25 subunidades em comprimento com capacidade para ligar um alvo selecionado para induzir salto de éxon no gene da distrofia humana, em que o oligômero antissenso compreende uma sequência de bases que é complementar a uma região alvo de éxon 53 do pré-mRNA de distrofina designada como um sítio de anelamento; e

[065]um peptídeo de penetração de célula (CPP) conjugado com o oligômero antissenso por uma porção química ligante.

[066]Em algumas modalidades, o sítio de anelamento é H53A(+36+60).

[067]Em algumas modalidades, as bases do oligômero antissenso são ligadas a estruturas de anel de morfolino, em que as estruturas de anel de morfolino são unidas por ligações intersubunidade que contêm fósforo que une um nitrogênio de morfolino de uma estrutura de anel a um carbono exocíclico 5' de uma estrutura de anel adjacente. Em certas modalidades, o peptídeo de penetração de célula é R<sub>6</sub> e a porção química ligante é uma glicina. Em algumas modalidades, o oligômero antissenso compreende a sequência de bases designada como a SEQ ID NO: 1, em que cada base timina (T) é opcionalmente uma base uracila (U).

[068]A menos que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados no presente documento têm o mesmo significado que o comumente entendido por aqueles de habilidade comum na técnica à qual a divulgação pertence. Embora quaisquer métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos

no presente documento possam ser usados na prática ou teste da presente divulgação, métodos e materiais preferenciais são descritos. Com os propósitos da presente divulgação, os termos a seguir são definidos abaixo.

### I. Definições

[069]Por “cerca de” entende-se uma quantidade, nível, valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento que varia por até 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1% a uma quantidade de referência, nível, valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento.

[070]O termo “alquila”, conforme usado no presente documento, a menos que especificado de outro modo, se refere a um hidrocarboneto linear ou ramificado saturado. Em certas modalidades, o grupo alquila é um hidrocarboneto primário, secundário ou terciário. Em certas modalidades, o grupo alquila inclui um a dez átomos de carbono, isto é, C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> alquila. Em certas modalidades, o grupo alquila inclui um a seis átomos de carbono, isto é, C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> alquila. Em certas modalidades, o grupo alquila é selecionado do grupo que consiste em metila, CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, CFCI<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>Cl, etila, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, propila, isopropila, butila, isobutila, sec-butila, t-butila, pentila, isopentila, neopentila, hexila, iso-hexila, 3-metilpentila, 2,2-dimetilbutila, e 2,3-dimetilbutila. O termo inclui tanto os grupos alquila substituída quanto não substituída, incluindo grupos alquila halogenada. Em certas modalidades, o grupo alquila é um grupo alquila fluorinada. Os exemplos não limitantes de porções químicas com as quais o grupo alquila pode ser substituído são selecionadas a partir do grupo que consiste em halogênio (flúor, cloro, bromo, ou iodo), hidroxila, amino, alquilamino, arilamino, alcóxi, arilóxi, nitro, ciano, ácido sulfônico, sulfato, ácido fosfônico, fosfato, ou fosfonato, não protegido ou protegido conforme necessário, conforme conhecido por aqueles versados na técnica, por exemplo, conforme ensinado em Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edição, 1991, aqui incorporado

a título de referência.

[071]“Passível a salto de éxon 53” conforme usado no presente documento com relação a um indivíduo ou paciente é destinado a incluir indivíduos e pacientes que têm uma ou mais mutações no gene de distrofina que, ausentes no salto de éxon 53 do pré-mRNA de distrofina, faz com que o quadro de leitura esteja fora de quadro, assim rompendo a tradução de pré-mRNA que leva a uma incapacidade do indivíduo ou paciente para produzir a distrofina funcional ou semifuncional. Os exemplos de mutações no gene de distrofina que são passíveis a salto de éxon 53 incluem, por exemplo, mutações exclusão de: éxons 42 a 52, éxons 45 a 52, éxons 47 a 52, éxons 48 a 52, éxons 49 a 52, éxons 50 a 52, ou éxon 52. Determinar a possibilidade de um paciente ter uma mutação no gene de distrofina que é passível a salto de éxon também está dentro do alcance de uma pessoa versada na técnica (consultar, por exemplo, Aartsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30:293 a 299; Gurvich et al., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633 a 640; e Fletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1.218 a 1.223.).

[072]O termo “oligômero” conforme usado no presente documento se refere a uma sequência de subunidades conectadas por ligações intersubunidades. Em certos casos, o termo “oligômero” é usado em referência a um “oligômero antissenso”. Para “oligômeros antissenso”, cada subunidade consiste em: (i) um açúcar de ribose ou um derivado do mesmo; e (ii) uma nucleobase ligada ao mesmo, de modo que a ordem das porções químicas de emparelhamento de bases forme uma sequência base que é complementar a uma sequência alvo num ácido nucleico (tipicamente um RNA) por emparelhamento de base de Watson-Crick, para formar um heteroduplex de ácido nucleico:oligômero na sequência alvo desde que a subunidade, a ligação intersubunidade, ou ambos não sejam de ocorrência natural. Em certas modalidades, o oligômero antissenso é um PMO. Em outras modalidades, o oligômero antissenso é um fosforotioato de 2'-O-metila. Em outras modalidades, o oligômero antissenso da divulgação

é um ácido nucleico de peptídeo (PNA), um ácido nucleico travado (LNA), ou um ácido nucleico em ponte (BNA), como ácido nucleico em ponte de 2'-O,4'-C-etileno (ENA). As modalidades exemplificativas adicionais são descritas no presente documento.

[073]Os termos “complementar” e “complementaridade” se referem a dois ou mais oligômeros (isto é, cada um compreende uma sequência de nucleobase) que são relacionados um com o outro por regras de emparelhamento de base de Watson-Crick. Por exemplo, a sequência de nucleobase “T-G-A (5'→3'),” é complementar à sequência de nucleobase “A-C-T (3'→ 5').” A complementaridade pode ser “parcial”, em que menos do que todas as nucleobases da dada sequência de nucleobase são correspondidas à outra sequência de nucleobase de acordo com regras de emparelhamento de base. Por exemplo, em algumas modalidades, a complementaridade entre uma dada sequência de nucleobase e a outra sequência de nucleobase pode ser cerca de 70%, cerca de 75%, cerca de 80%, cerca de 85%, cerca de 90% ou cerca de 95%. Ou pode haver complementaridade “completa” ou “perfeita” (100%) entre uma dada sequência de nucleobase e a outra sequência de nucleobase para continuar o exemplo. O grau de complementaridade entre sequências de nucleobase tem efeitos significantes na eficácia e força de hibridização entre as sequências.

[074]Os termos “quantidade eficaz” e “quantidade terapeuticamente eficaz” são usados de modo intercambiável no presente documento e se referem a uma quantidade de composto terapêutico, como um oligômero antissenso, administrado a um indivíduo mamífero, como uma dose única ou como parte de uma série de doses, a qual é eficaz para produzir um efeito terapêutico desejável. Para um oligômero antissenso, esse efeito é tipicamente trazido inibindo-se a tradução ou processamento de splicing natural de uma sequência alvo selecionada, ou produzindo-se uma quantidade clinicamente significante de distrofina (significância estatística).

[075]Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz é pelo menos 10

mg/kg, ou pelo menos 20 mg/kg de uma composição incluindo um oligômero antisenso por um período de tempo para tratar o indivíduo. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz é pelo menos 20 mg/kg de uma composição incluindo um oligômero antissenso para aumentar o número de fibras positivas em distrofina em um indivíduo a pelo menos 20% de normal. Em certas modalidades, uma quantidade eficaz é 10 mg/kg, ou pelo menos 20 mg/kg de uma composição incluindo um oligômero antissenso para estabilizar, manter ou melhorar a distância de caminhada de um déficit de 20%, por exemplo, em um 6 MWT, em um paciente, em relação a um par saudável. Em várias modalidades, uma quantidade eficaz é pelo menos 10 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, pelo menos 20 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, cerca de 25 mg/kg a cerca de 30 mg/kg, ou cerca de 30 mg/kg a cerca de 50 mg/kg. Em algumas modalidades, uma quantidade eficaz é cerca de 10 mg/kg, cerca de 20 mg/kg, cerca de 30 mg/kg, ou cerca de 50 mg/kg. Em outro aspecto, uma quantidade eficaz é pelo menos cerca de 10 mg/kg, cerca de 20 mg/kg, cerca de 25 mg/kg, cerca de 30 mg/kg, ou cerca de 30 mg/kg a cerca de 50 mg/kg, por pelo menos 24 semanas, pelo menos 36 semanas, ou pelo menos 48 semanas, para assim aumentar o número de fibras positivas em distrofina em um indivíduo a pelo menos 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, cerca de 95% de normal, e estabilizar ou melhorar a distância de caminhada a partir de um déficit de 20%, por exemplo em um 6 MWT, no paciente em relação a um par saudável. Em algumas modalidades, o tratamento aumenta o número de fibras positivas em distrofina a 20 a 60%, ou 30 a 50% de normal no paciente.

[076]Para “intensificar” ou “que intensifica”, ou “aumentar” ou “que aumenta”, ou “estimular” ou “que estimula”, se referem geralmente à capacidade de um ou mais conjugados de oligômero antissenso ou composições farmacêuticas para produzir ou causar uma resposta fisiológica maior (isto é, efeitos a jusante) em uma célula ou um

indivíduo, em comparação com a resposta causada por nenhum conjugado de oligômero antissenso ou um composto de controle. Uma resposta fisiológica maior pode incluir a expressão aumentada de uma forma funcional de uma proteína de distrofina, ou atividade biológica relacionada à distrofina aumentada em tecido muscular, entre outras respostas evidentes a partir do entendimento na técnica e na descrição no presente documento. A função muscular aumentada também pode ser medida, incluindo aumentos ou melhorias em função muscular por cerca 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%, ou 100%. A porcentagem de fibras musculares que expressam uma distrofina funcional também pode ser medida, incluindo expressão de distrofina aumentada em cerca de 1%, 2%, 5%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ou 100% de fibras musculares. Por exemplo, foi mostrado que cerca de 40% de melhora de função muscular pode ocorrer se 25 a 30% de fibras expressarem distrofina (consultar, por exemplo, Dello-Russo et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12.979 a 12.984, 2002). Uma quantidade “aumentada” ou “intensificada” é tipicamente uma quantidade “estatisticamente significante”, e pode incluir um aumento que é 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 ou mais vezes (por exemplo, 500, 1.000 vezes, incluindo todos os números inteiros e pontos decimais entre e acima de 1), por exemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) a quantidade produzida por nenhum conjugado de oligômero antissenso (a ausência de um agente) ou um composto de controle.

[077]Conforme usado no presente documento, os termos “função” e “funcional” e semelhantes se referem a uma função biológica, enzimática ou terapêutica.

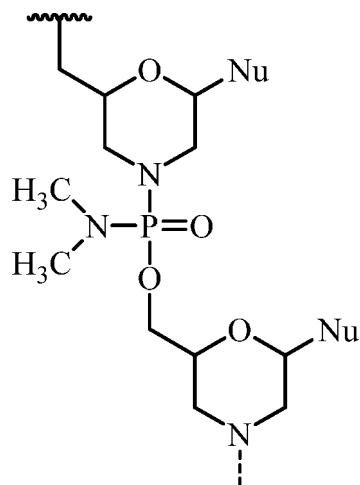
[078]Uma proteína de distrofina “funcional” se refere geralmente a uma proteína de distrofina que tem atividade biológica suficiente para reduzir a degradação progressiva de tecido muscular que é característico de outro modo de distrofia muscular,

tipicamente em comparação com a forma alterada ou “defeituosa” de proteína de distrofina que está presente em certos indivíduos com DMD ou BMD. Em certas modalidades, uma proteína de distrofina funcional pode ter cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% (incluindo todos os números inteiros entre os mesmos) da atividade biológica in vitro ou in vivo de distrofina de tipo selvagem, conforme medido de acordo com técnicas de rotina na técnica. Como um exemplo, a atividade relacionada à distrofina em culturas musculares in vitro pode ser medida de acordo com tamanho de miotubo, organização de miofibrila (ou desorganização), atividade contrátil, e agrupamento espontâneo de receptores de acetilcolina (consultar, por exemplo, Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209 a 216, 1999). Os modelos animais também são recursos valiosos para estudar a patogênese de doença, e fornecer um meio para testar atividade relacionada à distrofina. Dois dos modelos animais mais amplamente usados para pesquisa de DMD são o camundongo mdx e o cão com distrofia muscular golden retriever (GRMD), ambos os quais são negativos em distrofina (consultar, por exemplo, Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165 a 172, 2003). Esses e outros modelos animais podem ser usados para medir a atividade funcional de várias proteínas de distrofina. São incluídas formas truncadas de distrofina, como aquelas formas que são produzidas seguindo a administração de certos conjugados de oligômero antissenso de salto de éxon da presente divulgação.

[079]Os termos “divergência” ou “divergências” se referem a uma ou mais nucleobases (contíguas ou separadas) em uma sequência de nucleobase de oligômero que não é correspondida a um pré-mRNA alvo de acordo com regras de emparelhamento de base. Embora a complementaridade perfeita seja frequentemente desejável, algumas modalidades podem incluir um ou mais, mas preferencialmente 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 divergências em relação ao pré-mRNA alvo. As variações em qualquer localização no oligômero são incluídas. Em certas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso da divulgação incluem variações em sequência de nucleobase próximas

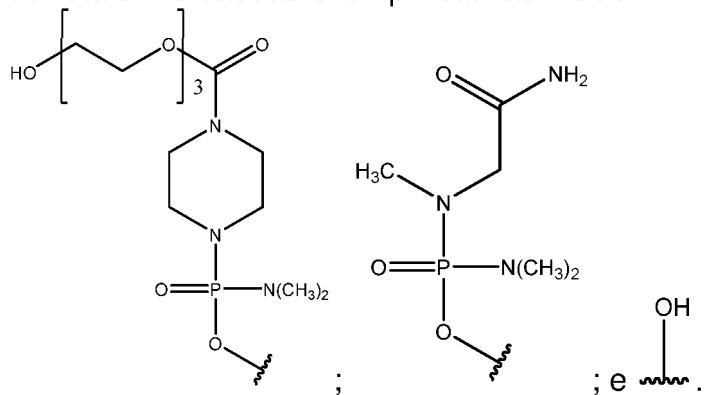
às variações de terminais no interior, e, se presentes, estão tipicamente dentro de 6, 5, 4, 3, 2, ou 1 subunidades do terminal 5' e/ou 3'.

[080] Os termos “morfólico”, “oligômero morfolino”, e “PMO” se referem a um oligômero de morfolino de fosforodiamidato da estrutura geral a seguir:

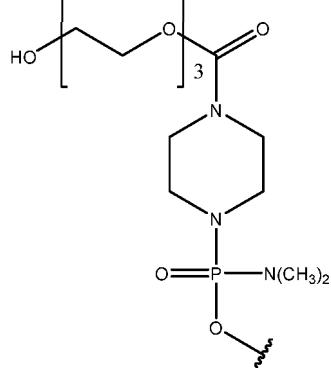


[081] e conforme descrito na Figura 2 de Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187 a 195 (1997). Morfolinos conforme descrito no presente documento incluem todos os estereoisômeros e tautômeros da estrutura geral supracitada. As características de síntese, estruturas e ligação de oligômeros de morfolino são detalhadas nas Patentes nº U.S.: 5.698.685; 5.217.866; 5.142.047; 5.034.506; 5.166.315; 5.521.063; 5.506.337; 8.076.476; e 8.299.206; todas as quais são incorporadas ao presente documento a título de referência.

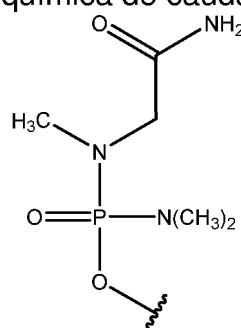
[082] Em certas modalidades, um morfolino é conjugado na extremidade 5' ou 3' do oligômero com uma porção química de “cauda” para aumentar sua estabilidade e/ou solubilidade. As caudas exemplificativas incluem:



[083] Das porções químicas de cauda exemplificativas acima, “TEG” ou “EG3” se refere à porção química de cauda a seguir:

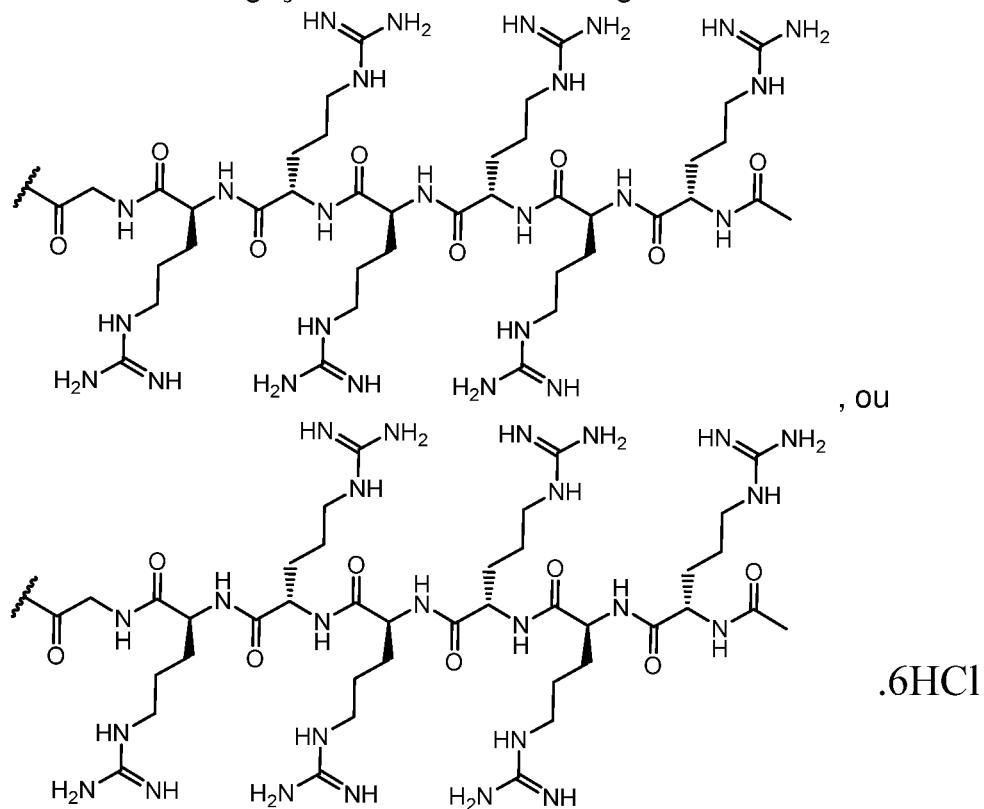


[084] Das porções químicas de cauda exemplificativas acima, “GT” se refere à porção química de cauda a seguir:



[085] Conforme usado no presente documento, os termos “-G-R<sub>6</sub>” e “-G-R<sub>6</sub>-Ac” são usados intercambiavelmente e se refere a uma porção química de peptídeo conjugada com um oligômero antissenso da divulgação. Em várias modalidades, “G” representa um resíduo glicina conjugado com “R<sub>6</sub>” por uma ligação de amida, e cada “R” representa um resíduo arginina conjugado em conjunto por ligações de amida de modo que “R<sub>6</sub>” signifique seis (6) resíduos de arginina conjugados juntos por ligações de amida. Os resíduos de arginina podem ter qualquer configuração estérica, por exemplo, os resíduos de arginina podem ser resíduos de L-arginina, resíduos de D-arginina, ou uma mistura de resíduos de D- e L-arginina. Em certas modalidades, “-G-R<sub>6</sub>” ou “-G-R<sub>6</sub>-Ac” é conjugado com o nitrogênio de anel morfolino da subunidade de morfolino mais 3' de um oligômero antissenso de PMO da divulgação. Em algumas

modalidades, “-G-R<sub>6</sub>” ou “-G-R<sub>6</sub>-Ac” é conjugado com a extremidade 3’ de um oligômero antisenso da divulgação e é da fórmula a seguir:

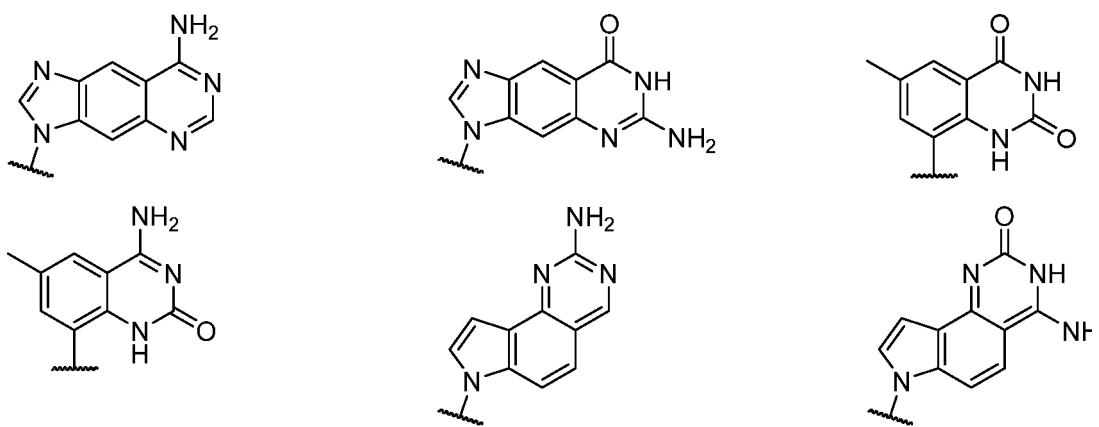


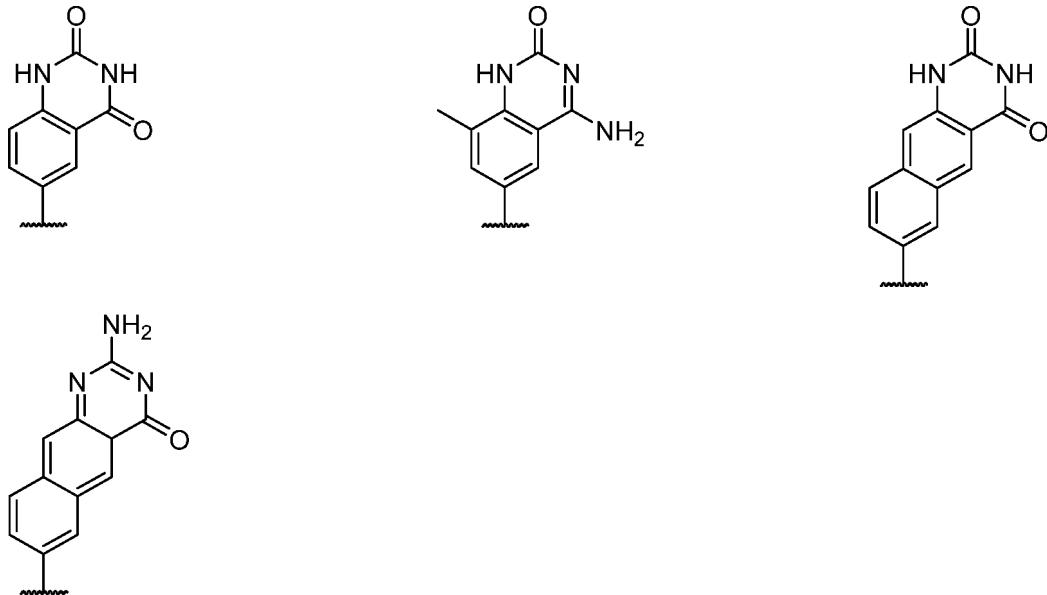
[086]Os termos “nucleobase” (Nu), “porção química de emparelhamento de base” ou “base” são usados intercambiavelmente para se referir a uma base purina ou pirimidina encontrada em DNA ou RNA de ocorrência natural ou “nativo” (por exemplo, uracila, timina, adenina, citosina, e guanina), assim como análogos dessas purinas e pirimidinas de ocorrência natural. Estes análogos podem conferir propriedades melhoradas, como afinidade de ligação, ao oligômero. Os análogos exemplificativos incluem hipoxantina (o componente base de inosina); 2,6-diaminopurina; 5-metil citosina; pirimidinas modificadas com C5-propinila; 10-(9-(aminoetoxi)fenoxazinil) (pinça em G) e semelhantes.

[087]Os exemplos adicionais de porções químicas de emparelhamento de base incluem, mas sem limitação, uracila, timina, adenina, citosina, guanina e hipoxantina (inosina) que tem seus respectivos grupos amino protegidos por grupos de

proteção acila, 2-fluorouracila, 2-fluorocitosina, 5-bromouracila, 5-iodouracila, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de pirimidina, como pseudoisocitosina e pseudouracila e outras nucleobases modificadas, como purinas 8-substituídas, xantina, ou hipoxantina (em que as últimas são os produtos de degradação natural). As nucleobases modificadas divulgadas em: Chiu e Rana, RNA, 2003, 9, 1.034 a 1.048; Limbach *et al.* Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2.183 a 2.196; e Revankar e Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, volume 7, 313; também são contemplados, cujos conteúdos são incorporados ao presente documento a título de referência.

[088]Os exemplos adicionais de porções químicas de emparelhamento de base incluem, mas sem limitação, nucleobases de tamanho expandido em que um ou mais anéis de benzeno foram adicionados. Substituições de base de ácido nucleico descritas em: the Glen Research catalog ([www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com)); Krueger AT *et al.*, Acc. Chem. Res., 2007, 40, 141 a 150; Kool, ET, Acc. Chem. Res., 2002, 35, 936 a 943; Benner S.A., *et al.*, Nat. Rev. Genet., 2005, 6, 553 a 543; Romesberg, F.E., *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., 2003, 7, 723 a 733; e Hirao, I., Curr. Opin. Chem. Biol., 2006, 10, 622 a 627; cujo conteúdo é incorporado ao presente documento a título de referência, são contempladas como úteis nos conjugados de oligômero antissenso descritos no presente documento. Os exemplos de nucleobases de tamanho expandido incluem aqueles mostrados abaixo, assim como formas tautoméricas dos mesmos.



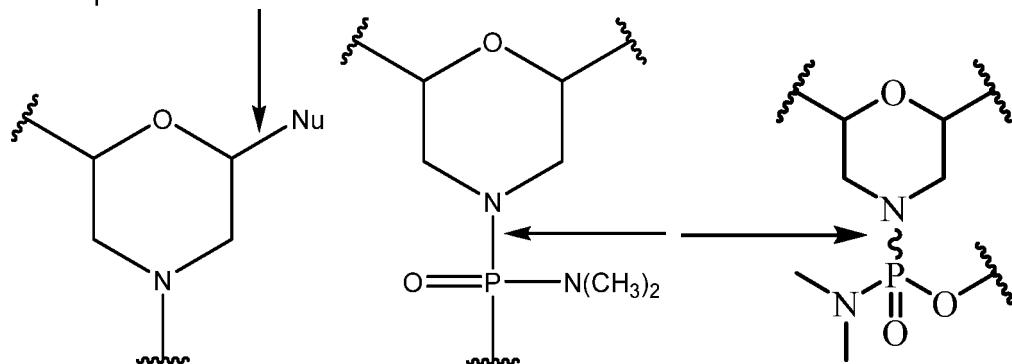


[089]As expressões “administração parentérica” e “administrado de modo parentérico” conforme usado no presente documento significam modos de administração diferentes de administração entérica e tópica, usualmente por injeção, e incluem, sem limitação, injeção e infusão intravenosas, intramusculares, intra-arteriais, intratecais, intracapsulares, intraorbitais, intracardíacas, intradérmicas, intraperitoneais, transteraqueais, subcutâneas, subcuticulares, intra-articulares, subcapsulares, subaracnoides, intraespinhais e intraesternais.

[090]Para clareza, as estruturas da divulgação incluindo, por exemplo, Fórmula (IV), são contínuas a partir de 5' a 3', e, para a conveniência de representação da estrutura inteira em forma compacta, vários cortes de ilustração marcados como “CORTE A”, “CORTE B” e “CORTE C” foram incluídos. Conforme seria entendido por uma pessoa versada na técnica, por exemplo, cada indicação de “CORTE A” mostra uma continuação da ilustração da estrutura nesses pontos. A pessoa versada na técnica entende que o mesmo é verdadeiro para cada caso de “CORTE B” e para “CORTE C” nas estruturas acima. Nenhum dos cortes de ilustração, entretanto, é destinado a indicar, nem a pessoa versada na técnica entender que os mesmos significam, uma descontinuação real da estrutura acima.

[091]Conforme usado no presente documento, um conjunto de chaves usado em uma fórmula estrutural indica que o recurso estrutural entre os parênteses é repetido. Em algumas modalidades, as chaves usadas podem ser “[“ e “”], e, em certas modalidades, as chaves usadas para indicar recursos estruturais em repetição podem ser “(“ e “”). Em algumas modalidades, o número de iterações de repetição do recurso estrutural entre as chaves é o número indicado fora das chaves, como 2, 3, 4, 5, 6, 7, e assim por diante. Em várias modalidades, o número de iterações de repetição do recurso estrutural entre as chaves é indicado por uma variável indicada fora das chaves, como “Z”.

[092]Conforme usado no presente documento, uma ligação reta ou uma ligação embaralhada desenhada para um carbono quiral ou átomo de fósforo em uma fórmula estrutural indica que a estereoquímica do carbono quiral ou fósforo é não definida e destinada a incluir todas as formas do centro quiral. Os exemplos de tais ilustrações são representados abaixo.



[093]A expressão “farmaceuticamente aceitável” significa que a substância ou composição deve ser compatível, quimicamente e/ou toxicologicamente, com os outros ingredientes que compreendem uma formulação, e/ou o indivíduo tratado com a mesma.

[094]A expressão “carreador farmaceuticamente aceitável” conforme usado no presente documento, significa uma carga, diluente, material de encapsulação ou formulação não-tóxica, sólida inerte, semissólida ou líquida, ou formulação auxiliar de

qualquer tipo. Alguns exemplos de materiais que podem servir como carreadores farmacologicamente aceitáveis são: açúcares, como lactose, glucose, e sacarose; amidos, como amido de milho e amido de batata; celulose e seus derivados, como carboximetil celulose sódica, etil celulose, e acetato de celulose; tragacanto em pó; malte; gelatina; talco; excipientes, como manteiga de cacau e ceras supositórias; óleos, como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de açafrão-bastardo, óleo de gergelim, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja; glicóis, como propileno glicol; ésteres, como oleato de etila e laurato de etila; ágar; agentes tamponantes, com hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; ácido algínico; água livre de pirogênio; solução salina isotônica; solução de Ringer; álcool etílico; soluções de tampão fosfato; lubrificantes compatíveis não tóxicos, como lauril sulfato de sódio e estearato de magnésio; agentes de coloração; agentes de liberação; agentes de revestimento; agentes adoçantes; agentes aromatizantes; agentes perfumantes; conservantes; e antioxidantes; de acordo com o julgamento do formulador.

[095]O termo “restauração” em relação à síntese ou produção de distrofina se refere geralmente à produção de uma proteína de distrofina incluindo formas truncadas de distrofina em um paciente com distrofia muscular após tratamento com um conjugado de oligômero antissenso descrito no presente documento. Em algumas modalidades, o tratamento resulta em um aumento na produção de distrofina inovadora em um paciente por 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% (incluindo todos os números inteiros entre os mesmos). Em algumas modalidades, o tratamento aumenta o número de fibras positivas em distrofina para pelo menos cerca de 20%, cerca de 30%, cerca de 40%, cerca de 50%, cerca de 60%, cerca de 70%, cerca de 80%, cerca de 90%, ou cerca de 95% a 100% do normal no indivíduo. Em outras modalidades, o tratamento aumenta o número de fibras positivas em distrofina a cerca de 20% a cerca de 60%, ou cerca de 30% a cerca de 50%, do normal no indivíduo. A porcentagem de fibras positivas em distrofina em um paciente que

segue o tratamento pode ser determinada por uma biópsia muscular com o uso de técnicas conhecidas. Por exemplo, uma biópsia muscular pode ser tomada a partir de um músculo adequado, como o músculo bíceps brachii em um paciente.

[096]A análise da porcentagem de fibras positivas em distrofina pode ser realizada pré-tratamento e/ou pós-tratamento ou em pontos no tempo ao longo do curso de tratamento. Em algumas modalidades, uma biópsia pós-tratamento é tomada a partir do músculo contralateral da biópsia pré-tratamento. A análise de expressão de distrofina pré e pós-tratamento pode ser realizada com o uso de qualquer ensaio adequado para distrofina. Em algumas modalidades, a detecção imuno-histoquímica é realizada em seções de tecido da biópsia muscular com o uso de um anticorpo que é um marcador para distrofina, como um anticorpo monoclonal ou policlonal. Por exemplo, o anticorpo MANDYS106 pode ser usado, o qual é um marcador altamente sensível para distrofina. Qualquer anticorpo secundário adequado pode ser usado.

[097]Em algumas modalidades, a porcentagem de fibras positivas em distrofina é calculada dividindo-se o número de fibras positivas pelas fibras totais contadas. As amostras de músculo normais têm 100% de fibras positivas em distrofina. Portanto, a porcentagem de fibras positivas em distrofina pode ser expressada como a porcentagem de normal. Para controlar a presença de níveis de traço de distrofina no músculo de pré-tratamento, assim como fibras revertentes, uma linha de base pode ser definida com o uso de seções de músculos de pré-tratamento de um paciente durante a contagem de fibras positivas em distrofina em músculos pós-tratamento. Isso pode ser usado como um limiar para contar fibras positivas em distrofina em seções de músculo pós-tratamento naquele paciente. Em outras modalidades, as seções de tecido manchado com anticorpo também podem ser usadas para quantificação de distrofina com o uso de software de análise de imagem Bioquant (Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). A intensidade de sinal de fluorescência de dis-

trofina total pode ser relatada como uma porcentagem de normal. Além disso, a análise de Western blot com anticorpos antidistrofina monoclonais ou policlonais pode ser usada para determinar a porcentagem de fibras positivas em distrofina. Por exemplo, o anticorpo anti-distrofina NCL-Dys1 de Leica Biosystems pode ser usado. A porcentagem de fibras positivas em distrofina também pode ser analisada determinando-se a expressão dos componentes do complexo de sarcoglicano ( $\beta, \gamma$ ) e/ou NOS neuronal.

[098]Em algumas modalidades, o tratamento com um conjugado de oligômero antissenso da divulgação atrasa ou reduz a disfunção e/ou insuficiência muscular respiratória progressiva em pacientes com DMD em relação ao que seria esperado sem tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento com um conjugado de oligômero antissenso da divulgação pode reduzir ou eliminar a necessidade por assistência de ventilação que seria esperada sem o tratamento. Em algumas modalidades, as medições de função respiratória para acompanhar o curso da doença, assim como a avaliação de intervenções terapêuticas potenciais incluem pressão inspiratória máxima (MIP), pressão expiratória máxima (MEP), e capacidade vital forçada (FVC). MIP e MEP medem o nível de pressão que uma pessoa pode gerar durante inalação e exalação, respectivamente, e são medidas sensíveis de força de músculo respiratório. MIP é uma medida de fraqueza muscular de diafragma.

[099]Em algumas modalidades, MEP pode cair antes das mudanças em outros testes de função pulmonar, incluindo MIP e FVC. Em certas modalidades, MEP pode ser um indicador inicial de disfunção respiratória. Em certas modalidades, FVC pode ser usado para medir o volume total de ar expelido durante exalação forçada após a inspiração máxima. Em pacientes com DMD, FVC aumenta concomitantemente com o crescimento físico até o início da adolescência. Entretanto, à medida que o crescimento atrasa ou é impedido por progresso da doença, e a fraqueza de músculo progride, a capacidade vital entra em uma fase descendente e cai em uma taxa média de cerca de 8 a 8,5 por cento por ano após 10 a 12 anos de idade. Em certas

modalidades, a porcentagem de MIP prevista (MIP ajustada por peso), a porcentagem de MEP prevista (MEP ajustada por idade), e a porcentagem de FVC prevista (FVC ajustada por idade e altura) são análises de suporte.

[0100]Os termos “indivíduo” e “paciente” conforme usado no presente documento incluem qualquer animal que exibe um sintoma, ou tem risco de exibir um sintoma, que pode ser tratado com um conjugado de oligômero antissenso da divulgação, como um indivíduo (ou paciente) que tem ou tem risco de ter DMD ou BMD, ou qualquer um dos sintomas associados a estas afecções (por exemplo, perda de fibra muscular). Os indivíduos adequados (ou pacientes) incluem animais de laboratório (como camundongo, rato, coelho, ou porquinho-da-índia), animais de fazenda, e animais domésticos ou animais de estimação (como um cão ou gato). Os primatas não humanos e, preferencialmente, pacientes humanos (ou sujeitos), são incluídos. Também são incluídos os métodos para produzir distrofina em um indivíduo (ou paciente) que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 51.

[0101]As expressões “administração sistêmica”, “administrada sistematicamente”, “administração periférica” e “administrado perifericamente” conforme usado no presente documento significam a administração de um composto, fármaco ou outro material diferente de diretamente no sistema nervoso central, de modo que entre no sistema do paciente e, desse modo, seja submetido ao metabolismo e outros processos semelhantes, por exemplo, administração subcutânea.

[0102]A expressão “sequência alvo” se refere a uma sequência de nucleobases de um oligômero que é complementar a uma sequência de nucleotídeos em um pré-mRNA alvo. Em algumas modalidades da divulgação, a sequência de nucleotídeos no pré-mRNA alvo é um sítio de anelamento de éxon 51 no pré-mRNA de distrofina designado como H51A(+66+95).

[0103]O “tratamento” de um indivíduo (por exemplo, um mamífero, como um ser humano) ou uma célula é qualquer tipo de intervenção usada em uma tentativa de

alterar o curso natural do indivíduo ou célula. O tratamento inclui, mas sem limitação, a administração de um oligômero ou uma composição farmacêutica do mesmo, e pode ser realizada profilaticamente ou subsequente à iniciação de um evento patológico ou contato com um agente etiológico. O tratamento inclui qualquer efeito desejável nos sintomas ou patologia de uma doença ou afecção associada à proteína de distrofina, como em certas formas de distrofia muscular, e pode incluir, por exemplo, mudanças ou melhorias mínimas em um ou mais marcadores mensuráveis da doença ou afecção tratada. Também são incluídos tratamentos “profiláticos”, os quais podem ser direcionados à redução da taxa de progresso da doença ou afecção em tratamento, retardar o início daquela doença ou afecção, ou reduzir a severidade de seu início. “Tratamento” ou “profilaxia” não necessariamente indicam erradicação completa, cura ou prevenção da doença ou afecção, ou sintomas associados dos mesmos.

[0104]Em algumas modalidades, o tratamento com um conjugado de oligômero antissenso da divulgação aumenta a produção de distrofina inovadora, retarda a progressão de doença, atrasa ou reduz a perda de ambulação, reduz a inflamação muscular, reduz danos musculares, melhora a função muscular, reduz a perda de função pulmonar, e/ou intensifica a regeneração muscular que seria esperada sem tratamento. Em algumas modalidades, o tratamento mantém, retarda ou atrasa a progressão de doença. Em algumas modalidades, o tratamento mantém a ambulação ou reduz a perda de ambulação. Em algumas modalidades, o tratamento mantém a função pulmonar ou reduz a perda de função pulmonar. Em algumas modalidades, o tratamento mantém ou aumenta uma distância de caminhada estável em um paciente, conforme medido por, por exemplo, o Teste de Caminhada de 6 Minutos (6MWT). Em algumas modalidades, o tratamento mantém ou reduz o tempo para caminhar/correr 10 metros (isto é, o teste de caminhada/corrida de 10 metros). Em algumas modalidades, o tratamento mantém ou reduz o tempo para levantar de posição de supinação (isto é, teste de tempo para levantar). Em algumas modalidades, o tratamento mantém

ou reduz o tempo para subir quatro escadas padrão (*isto é*, o teste de subida de quatro escadas). Em algumas modalidades, o tratamento mantém ou reduz a inflamação muscular no paciente, conforme medido por, por exemplo, MRI (por exemplo, MRI dos músculos da perna). Em algumas modalidades, MRI mede T2 e/ou fração de gordura para identificar a degeneração muscular. MRI pode identificar mudanças em estrutura e composição musculares causadas por inflamação, edema, danos musculares, e infiltração de gordura.

[0105]Em algumas modalidades, o tratamento com um conjugado de oligômero antissenso da divulgação aumenta a produção de distrofina inovadora e atrasa ou reduz a perda de ambulação que seria esperada sem o tratamento. Por exemplo, o tratamento pode estabilizar, manter, melhorar ou aumentar a capacidade para caminhar (por exemplo, estabilização de ambulação) no indivíduo. Em algumas modalidades, o tratamento mantém ou aumenta uma distância de caminhada estável em um paciente, conforme medido por, por exemplo, o Teste de Caminhada de 6 Minutos (6MWT), descrito por McDonald, et al. (Muscle Nerve, 2010; 42:966 a 974, incorporado ao presente documento a título de referência). Uma mudança na Distância de Caminhada de 6 Minutos (6MWD) pode ser expressada como um valor absoluto, uma mudança de porcentagem ou uma mudança na % de valor previsto. Em algumas modalidades, o tratamento mantém ou melhora uma distância de caminhada estável em um 6MWT de um déficit de 20% no indivíduo em relação a um par saudável. O desempenho de um paciente com DMD no 6MWT em relação ao desempenho típico de um par saudável pode ser determinado calculando-se uma % de valor previsto. Por exemplo, a % de 6MWD prevista pode ser calculada com o uso da equação a seguir para machos:  $196,72 + (39,81 \times \text{idade}) - (1,36 \times \text{idade}^2) + (132,28 \times \text{altura em metros})$ . Para fêmeas, a % de 6MWD prevista pode ser calculada com o uso da equação a seguir:  $188,61 + (51,50 \times \text{idade}) - (1,86 \times \text{idade}^2) + (86,10 \times \text{altura em metros})$  (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, versão 2, incorporado ao presente documento a título

de referência). Em algumas modalidades, o tratamento com um oligômero antissenso aumenta a distância de caminhada estável no paciente a partir da linha de base para maior do que 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, ou 50 metros (incluindo todos os números inteiros entre os mesmos).

[0106]A perda de função muscular em pacientes com DMD pode ocorrer contra o fundo de crescimento e desenvolvimento infantil. Certamente, as crianças mais jovens com DMD podem mostrar um aumento em distância caminhada durante 6MWT ao longo do curso de cerca de 1 ano apesar de prejuízo muscular progressivo. Em algumas modalidades, o 6MWD de pacientes com DMD é comparado a desenvolver tipicamente os indivíduos de controle e para dados normativos de indivíduos correspondentes em idade e sexo. Em algumas modalidades, o crescimento e o desenvolvimento normais podem ser considerados com o uso de uma equação com base em idade e altura ajustada a dados normativos. Tal equação pode ser usada para converter 6MWD a uma porcentagem de valor previsto (% prevista) em indivíduos com DMD. Em certas modalidades, a análise de % prevista de dados de 6MWD representa um método para responder por crescimento e desenvolvimento normal, e pode mostrar que ganhos em função em idades precoces (por exemplo, menos do que ou igual à idade 7) se representam estáveis em vez de melhorar as capacidades em pacientes com DMD (Henricson et al. PLoS Curr., 2012, versão 2, incorporado ao presente documento a título de referência).

[0107]Um sistema de nomenclatura de molécula antissenso foi proposto e publicado para se distinguir entre as moléculas antissenso diferentes (consultar Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644 a 654). Essa nomenclatura se tornou especialmente relevante durante o teste de diversas moléculas antissenso levemente diferentes, todas direcionadas na mesma região alvo, conforme mostrado abaixo:

H#A/D(x:y).

[0108] A primeira letra designa as espécies (por exemplo H: humano, M: mu-  
rino, C: canino). “Nº” designa o número de éxon de distrofina alvo. “A/D” indica sítio  
de splicing aceitante ou doador no começo e fim do éxon, respectivamente. (x y) re-  
presenta as coordenadas de anelamento em que “-” ou “+” indicam sequências intrô-  
nicas ou exônicas, respectivamente. Por exemplo, A(-6+18) indicaria as últimas 6 ba-  
ses do ítron que precedem o éxon alvo e as primeiras 18 bases do éxon alvo. O sítio  
de splicing mais próximo seria o aceitante para que essas coordenadas sejam prece-  
didas com um “A”. Descrever coordenadas de anelamento no sítio de splicing doador  
poderia ser D(+2-18) enquanto as últimas 2 bases exônicas e as primeiras 18 bases  
intrônicas correspondem ao sítio de anelamento da molécula antissenso. As coorde-  
nadas de anelamento inteiramente exônicas seriam representadas por A(+65+85),  
que é o sítio entre o 65º e 85º nucleotídeo do começo daquele éxon.

## II. Oligômeros Antissenso

### A. Conjugados de Oligômero Antissenso projetados para induzir salto de éxon

53

[0109] Em certas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso da di-  
vulgação são complementares a uma região alvo de éxon 53 do gene de distrofina e  
induzem o salto de éxon 53. Em particular, a divulgação se refere a conjugados de  
oligômero antissenso complementares a uma região alvo de éxon 53 do pré-mRNA  
de distrofina designado como um sítio de anelamento. Em algumas modalidades, o  
sítio de anelamento é H53A(+36+60).

[0110] Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação alvejam pré-  
mRNA de distrofina e induzem o salto de éxon 53, de modo que sejam excluídos ou  
saltados da transcrição de mRNA submetida a splicing madura. Saltando-se o éxon  
53, o quadro de leitura rompido é restaurado para uma mutação em quadro. Embora  
DMD seja compreendido de vários subtipos genéticos, conjugados de oligômero an-  
tissenso da divulgação foram especificamente projetados para saltar o éxon 53 de

pré-mRNA de distrofina. As mutações de DMD passíveis a salto de éxon 53 compreendem um subgrupo de pacientes com DMD (8%).

[0111]A sequência de nucleobase de um conjugado de oligômero antissenso que induz o salto de éxon 53 é projetada para ser complementar a uma sequência alvo específica dentro do éxon 53 de pré-mRNA de distrofina. Em algumas modalidades, um oligômero antissenso do conjugado de oligômero antissenso é um PMO em que cada anel morfolino do PMO é ligado a uma nucleobase incluindo, por exemplo, nucleobases encontradas em DNA (adenina, citosina, guanina, e timina).

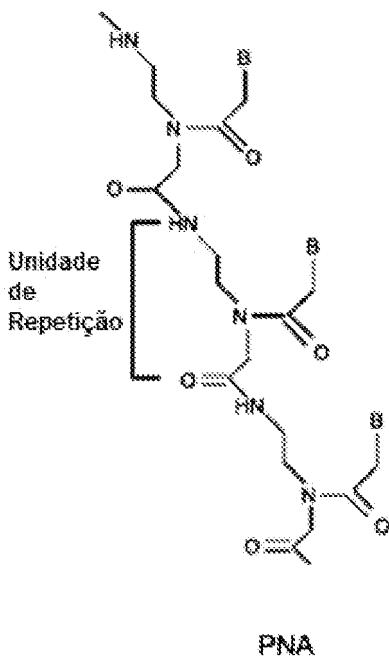
#### B. Recursos de Química de Oligômero

[0112]Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação podem empregar uma variedade de produtos químicos de oligômero antissenso. Os exemplos de produtos químicos de oligômero incluem, sem limitação, oligômeros de morfolino, oligômeros modificados com fosforotioato, oligômeros modificados com 2' O-metila, ácido nucleico de peptídeo (PNA), ácido nucleico travado (LNA), oligômeros de fosforotioato, oligômeros modificados com 2' O-MOE, oligômero modificado com 2'-fluoro, ácidos nucleicos com ponte de 2'O,4'C (ENAs), triciclo-DNAs, subunidades de triciclo-DNA fosforotioato, oligômeros modificados com 2'-O-[2-(N-metilcarbamoi)etila], incluindo combinações de qualquer um dos supracitados. Fosforotioato e químicas modificadas com 2'-O-Me podem ser combinados para gerar uma cadeia principal de 2'O-Me-fosforotioato. Consultar, por exemplo, as Publicações nº PCT WO/2013/112053 e WO/2009/008725, as quais são incorporadas ao presente documento a título de referência em suas totalidades. As modalidades exemplificativas de produtos químicos de oligômero da divulgação são adicionalmente descritas abaixo.

##### 1. Ácidos Nucleicos de Peptídeo (pnas)

[0113]Os ácidos nucleicos de peptídeo (PNAs) são análogos de DNA nos quais a cadeia principal é estruturalmente homomorfa com uma cadeia principal de desoxirribose, que consiste em unidades de N-(2-aminoetil) glicina às quais as bases

de pirimidina ou purina são ligadas. Os PNAs que contêm bases de pirimidina e purina naturais hibridizam para oligômeros complementares que obedecem regras de emparelhamento de base de Watson-Crick, e mimetizam DNA em termos de reconhecimento de par de bases (Egholm, Buchardt et al. 1993). A cadeia principal de PNAs é formada por ligações de peptídeo em vez de ligações de fosfodiéster, tornando as mesmas bem adequadas para aplicações antissenso (consultar estrutura abaixo). A cadeia principal é não carregada, resultando em duplexações de PNA/DNA ou PNA/RNA que exibem estabilidade térmica maior do que normal. PNAs não são reconhecidos por nucleases ou proteases. Um exemplo não limitante de um PNA é representado abaixo.



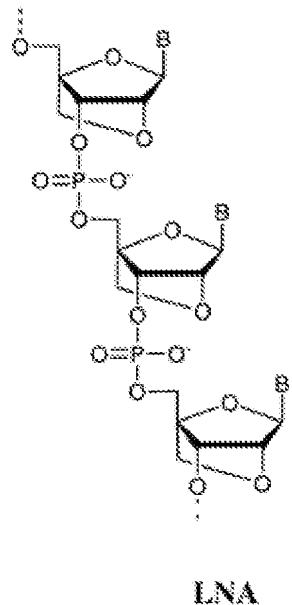
[0114] Apesar de uma mudança estrutural de radical na estrutura natural, os PNAs têm capacidade para ligação específica de sequência em uma forma de hélice para DNA ou RNA. As características de PNAs incluem uma alta afinidade de ligação para DNA ou RNA complementar, um efeito desestabilizante causado por divergência de base única, resistência a nucleases e proteases, hibridização com DNA ou RNA independente de concentração de sal e formação de triplexação com DNA de homopurina. PANAGENE™ desenvolveu seus monômeros de Bts PNA proprietários (Bts;

grupo benzotiazol-2-sulfonila) e processo de oligomerização proprietário. A oligomerização de PNA com o uso de monômeros Bts PNA é composta de ciclos repetitivos de desproteção, acoplamento e capeamento. PNAs podem ser produzidos sinteticamente com o uso de qualquer técnica conhecida na técnica. Consultar, por exemplo, Patentes nº U.S.: 6.969.766; 7.211.668; 7.022.851; 7.125.994; 7.145.006; e 7.179.896. Também consultar as Patentes nº U.S.: 5.539.082; 5.714.331; e 5.719.262 para a preparação de PNAs. O ensinamento adicional de compostos de PNA pode ser encontrado em Nielsen et al., *Science*, 254:1.497 a 1.500, 1991. Cada um dos supracitados é incorporado a título de referência em sua totalidade.

## 2. Ácidos Nucleicos Travados (Inas)

[0115]Os conjugados de oligômero antissenso também podem conter subunidades de “ácido nucleico travado” (LNAs). “LNAs” são um membro de uma classe de modificações chamadas de ácido nucleico com ponte (BNA). BNA é caracterizado por uma ligação covalente que trava a conformação do anel de ribose em um C30-endo sugar pucker (northern). Para LNA, a ponte é composta de um metileno entre as posições 2'-O e 4'-C. LNA intensifica a pré-organização de cadeia principal e empilhamento de base para aumentar a hibridização e estabilidade térmica.

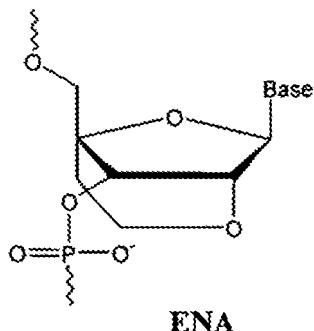
[0116]As estruturas de LNAs podem ser encontradas, por exemplo, em Wengel, et al., *Chemical Communications* (1998) 455; Koshkin et al., *Tetrahedron* (1998) 54:3607; Jesper Wengel, *Accounts of Chem. Research* (1999) 32:301; Obika, et al., *Tetrahedron Letters* (1997) 38:8735; Obika, et al., *Tetrahedron Letters* (1998) 39:5401; e Obika, et al., *Bioorganic Medicinal Chemistry* (2008) 16:9.230, os quais são incorporados ao presente documento a título de referência, em sua totalidade. Um exemplo não limitante de um LNA é representado abaixo.



LNA

[0117] Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação podem incorporar um ou mais LNAs; em alguns casos, os conjugados de oligômero antissenso podem ser inteiramente compostos de LNAs. Os métodos para a síntese de subunidades de nucleosídeo de LNA e sua incorporação em oligômeros são descritos, por exemplo, nas Patentes nº U.S.: 7.572.582; 7.569.575; 7.084.125; 7.060.809; 7.053.207; 7.034.133; 6.794.499; e 6.670.461; em que cada um é incorporado ao presente documento a título de referência, em sua totalidade. Os ligantes intersubunidade típicos incluem porções químicas fosfodiéster e fosforodioato; alternativamente, os ligantes que não contêm fósforo podem ser empregados. As modalidades adicionais incluem um LNA que contém conjugado de oligômero antissenso em que cada subunidade de LNA é separada por uma subunidade de DNA. Certos conjugados de oligômero antissenso são compostos de subunidades LNA e DNA alternantes em que o ligante intersubunidade é fosforotioato.

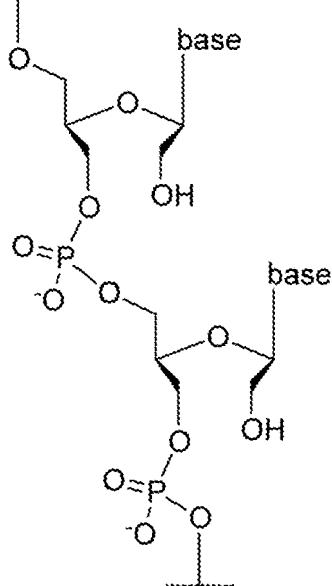
[0118] Ácidos nucleicos de ponte de 2'O,4'C-etileno (ENAs) são outro membro da classe de BNAs. Um exemplo sem limitação é representado abaixo.



[0119] Oligômeros de ENA e sua preparação são descritos em Obika *et al.*, *Tetrahedron Lett* (1997) 38 (50): 8.735, que está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade. Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação podem incorporar uma ou mais subunidades de ENA.

### 3. Ácido Nucleico Desbloqueado (una)

[0120] Os conjugados de oligômero antissenso também podem conter subunidades de ácido nucleico desbloqueado (UNA). Oligômeros de UNAs e UNA são um análogo de RNA no qual a ligação C2'-C3' da subunidade foi clivada. Enquanto LNA é restrinido de maneira conformacional (com relação ao DNA e RNA), UNA é muito flexível. UNAs são divulgados, por exemplo, no documento nº WO 2016/070166. Um exemplo sem limitação de um UNA é representado abaixo.

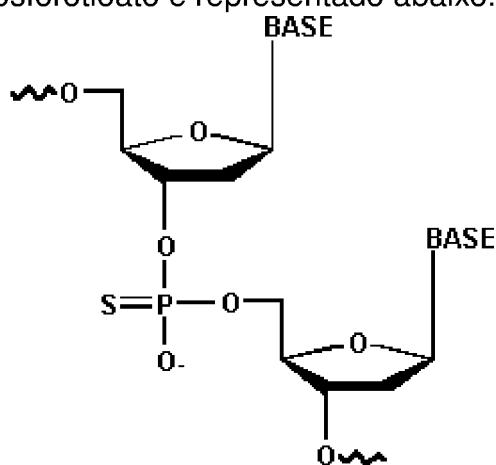


[0121] Ligantes entre subunidades típicos incluem porções químicas de fosfo-diéster e fosforotioato; alternativamente, ligantes que não contêm fósforo podem ser

empregados.

#### 4. Fosforotioatos

[0122]“Fosforotioatos” (ou oligos S) são uma variante de DNA normal na qual um dos oxigênios sem ponte é substituído por um enxofre. Um exemplo sem limitação de um fosforotioato é representado abaixo.



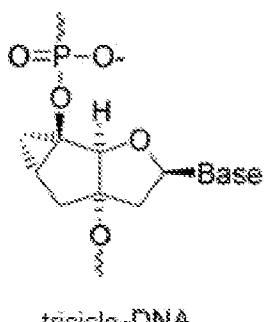
[0123]A sulfurização da ligação internucleotídeo reduz a ação de endo e exonucleases que inclui exonuclease POL 1 de DNA 5' a 3' e 3' a 5', nucleases S1 e P1, RNases, nucleases séricas e fosfodiesterase de veneno de cobra. Fosforotioatos são produzidos através de duas rotas principais: através da ação de uma solução de enxofre elementar em dissulfeto de carbono em um fosfonato de hidrogênio, ou através do método de sulfurização de triésteres de fosfito com dissulfeto de tetraetiltiurama (TETD) ou 1,1-dióxido de 3H-1,2-bensoditiol-3-ona (BDTD) (consultar, por exemplo, Iyer *et al.*, J. Org. Chem. 55, 4.693 a 4.699, 1990, que está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade). Os últimos métodos evitam o problema de insolubilidade do enxofre elementar na maioria dos solventes orgânicos e a toxicidade de dissulfeto de carbono. Os métodos TETD e BD TD também rendem fosforotioatos de pureza superior.

#### 5. Subunidades De Triciclo-Dnas E Triciclo-Fosforotioato

[0124]Triciclo-DNAs (tc-DNA) são uma classe de análogos de DNA restritos nos quais cada nucleotídeo é modificado pela introdução de um anel de ciclopropano

para restringir flexibilidade conformacional da estrutura principal e para otimizar a geometria de estrutura principal do ângulo de torsão  $\gamma$ . tc-DNAs que contêm adenina e timina homobásicos formam pares de base A-T extraordinariamente estáveis com RNAs complementares. Triciclo-DNAs e sua síntese são descritos na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2010/115993, que está incorporada aqui a título de referência em sua totalidade. Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação podem incorporar uma ou mais subunidades de triciclo-DNA; em alguns casos, os conjugados de oligômero antissenso podem ser inteiramente compostos por subunidades de triciclo-DNA.

[0125]Subunidades de triciclo-fosforotioato são subunidades de triciclo-DNA com ligações entre subunidades de fosforotioato. Subunidades de triciclo-fosforotioato e sua síntese são descritas na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2013/053928, que está incorporada aqui a título de referência em sua totalidade. Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação podem incorporar uma ou mais subunidades de triciclo-DNA; em alguns casos, os conjugados de oligômero antissenso podem ser inteiramente compostos por subunidades de triciclo-DNA. Um exemplo sem limitação de uma subunidade de triciclo-DNA/triciclo-fosfotioato é representado abaixo.

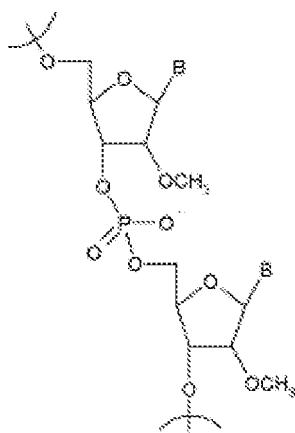


triciclo-DNA

## 6. Oligômeros de 2' O-Metila, 2' O-MOE e 2'-F

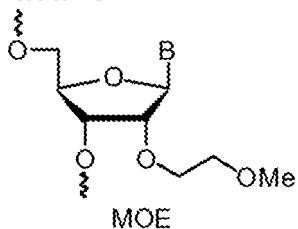
[0126]Moléculas de “oligômero de 2'-O-Me” carregam um grupo metila no resíduo 2'-OH da molécula de ribose. RNAs 2'-O-Me mostram o mesmo (ou similar) comportamento que o DNA, porém, são protegidos contra degradação de nuclease.

RNAs 2'-O-Me também podem ser combinados com oligômeros de fosforotioato (PTOs) para estabilização adicional. Oligômeros de 2'O-Me (fosfodiéster ou fosfotioato) podem ser sintetizados de acordo com técnicas de rotina na arte (consultar, por exemplo, Yoo *et al.*, Nucleic Acids Res. 32:2.008 a 16, 2004, que está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade). Um exemplo sem limitação de um oligômero de 2' O-Me é representado abaixo.

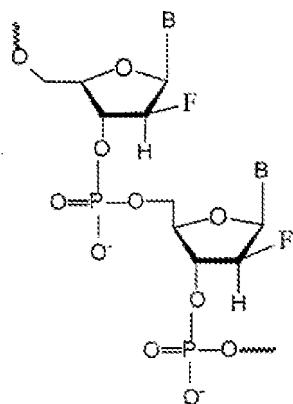


2' O-Me

[0127] Oligômeros de 2' O-metoxietila (2'-O MOE) carregam um grupo metoxietila no resíduo 2'-OH da molécula de ribose e são abordados em Martin *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 78, 486 a 504, 1995, que está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade. Um exemplo sem limitação de uma subunidade de 2'O MOE é representado abaixo.



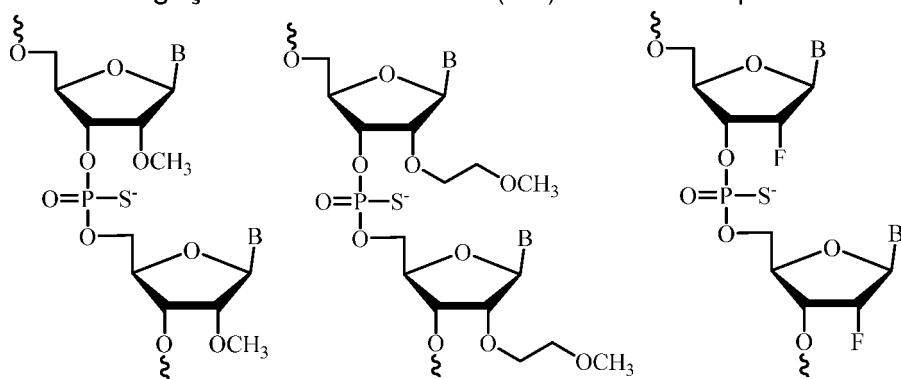
[0128] Oligômeros de 2'-fluoro (2'-F) têm um radical de flúor na posição 2' no lugar de 2'OH. Um exemplo sem limitação de um oligômero de 2'-F é representado abaixo.



2'-F

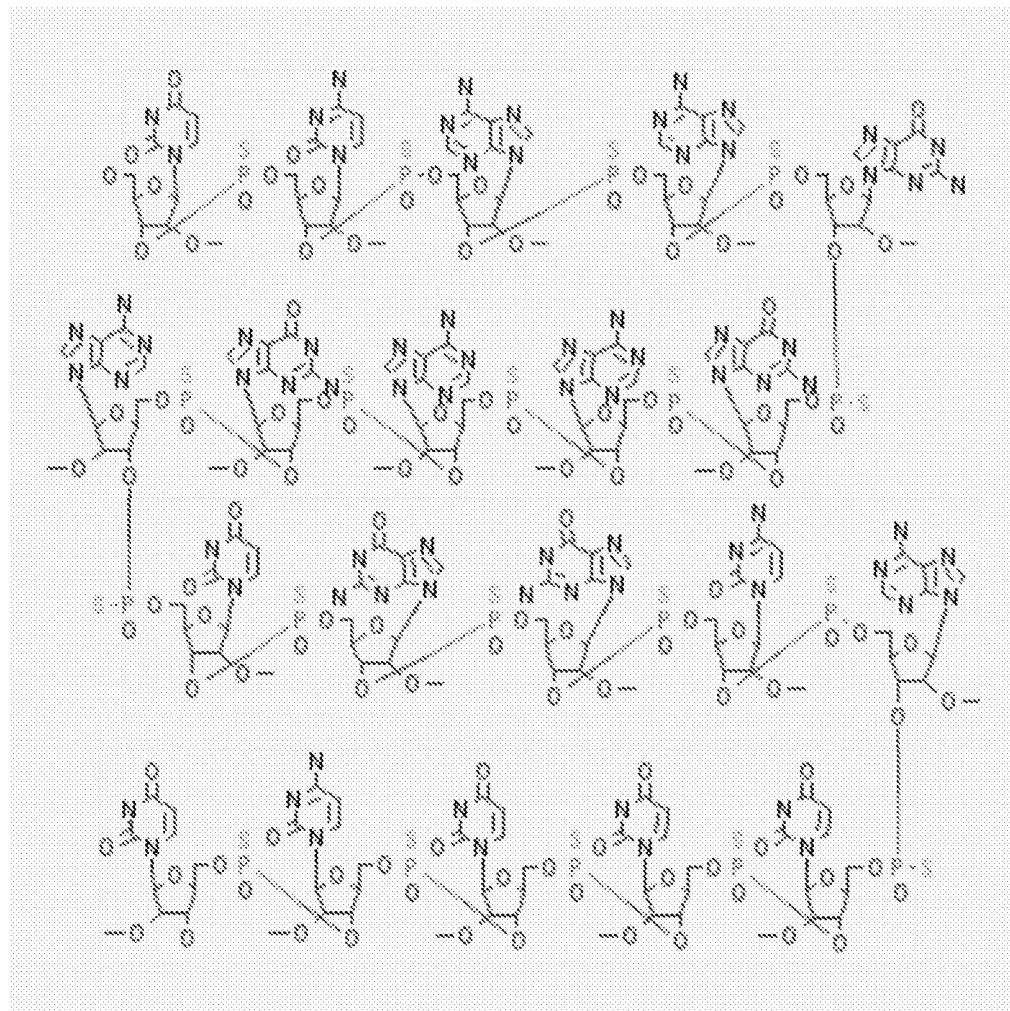
[0129] Oligômeros de 2'-fluoro são descritos adicionalmente no documento nº WO 2004/043977, que está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade.

[0130] Oligômeros de 2'O-metila, 2' O-MOE e 2'-F também podem compreender uma ou mais ligações de fosforotioato (PS) conforme representado abaixo.

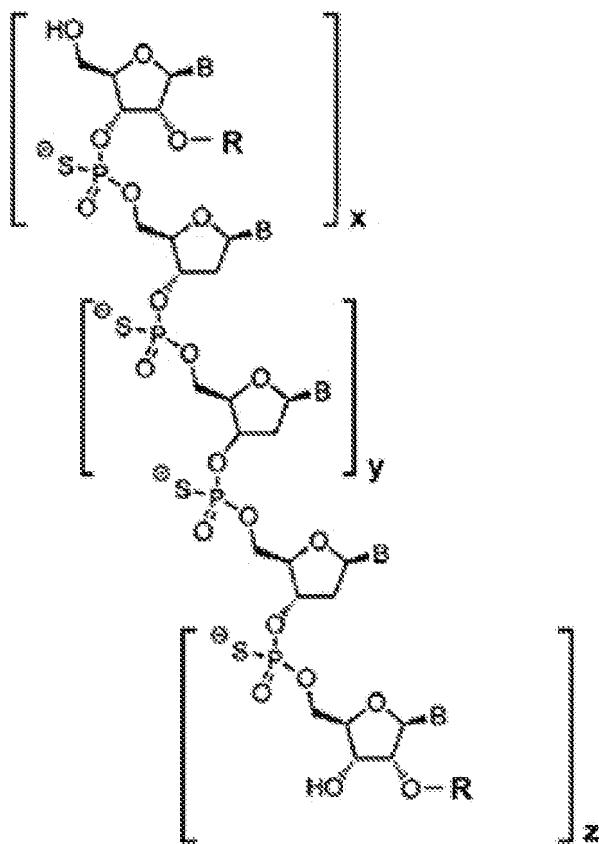


PS de 2'O-Metila PS de 2'O-MOE PS de 2'-F

[0131] Adicionalmente, oligômeros de 2'O-metila, 2' O-MOE e 2'-F podem compreender ligações entre subunidades de PS ao longo do oligômero, por exemplo, como na dispersão de oligômero de PS de 2'O-metila representada abaixo.



[0132]Alternativamente, oligômeros de 2' O-metila, 2' O-MOE e/ou 2'-F podem compreender ligações de PS nas extremidades do oligômero, conforme representado abaixo.



[0133]em que:

[0134]R é  $CH_2CH_2OCH_3$  (metoxietila ou MOE); e

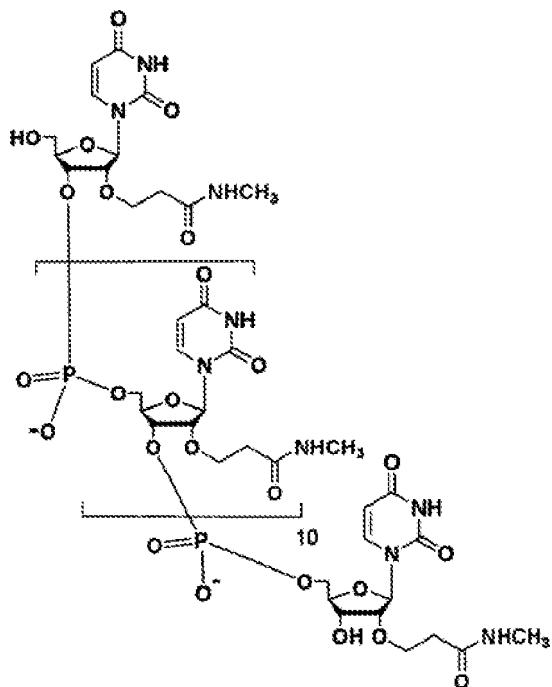
[0135]x, y e z denotam o número de nucleotídeos contidos em cada uma das regiões asa 5', intervalo central e asa 3' designadas, respectivamente.

[0136]Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação podem incorporar uma ou mais subunidades de 2' O-metila, 2' O-MOE e 2'-F e podem utilizar qualquer uma das ligações entre subunidades descritas aqui. Em alguns casos, um conjugado de oligômero antissenso da divulgação pode ser composto inteiramente por subunidades de 2'O-metila, 2' O-MOE ou 2'-F. Uma modalidade de um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é composta inteiramente por subunidades de 2'O-metila.

#### 7. Oligômeros de 2'-O-[2-(N-METILCARBAMOIL)ETILA] (MCES)

[0137]MCEs são outro exemplo de ribonucleosídeos de 2'O modificados úteis nos conjugados de oligômero antissenso da divulgação. Aqui, o 2'OH é derivado para

uma porção química de 2-(N-metilcarbamoil)etila para aumentar a resistência à nuclease. Um exemplo sem limitação de um oligômero de MCE é representado abaixo.

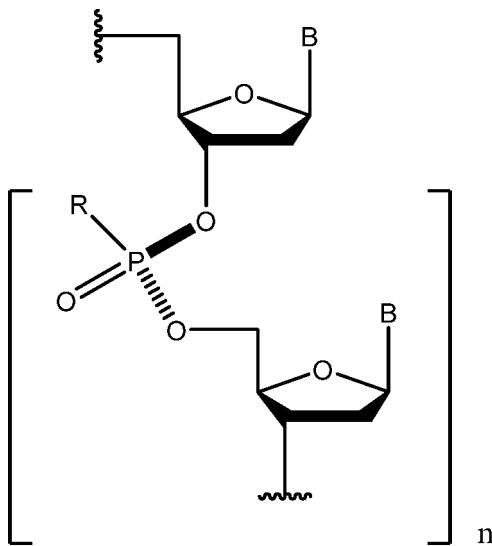


MCE

[0138]MCEs e sua síntese são descritos em Yamada *et al.*, *J. Org. Chem.* (2011) 76(9):3.042 a 53, que está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade. Os conjugados de oligômero antissenso da divulgação podem incorporar uma ou mais subunidades de MCE.

#### 8. Oligômeros Específicos Estéreos

[0139]Oligômeros específicos estéreos são aqueles nos quais a estereoquímica de cada ligação que contém fósforo é fixada pelo método de síntese de modo que um oligômero substancialmente estéreo puro seja produzido. Um exemplo sem limitação de um oligômero específico estéreo é representado abaixo.



[0140]No exemplo acima, cada fósforo do oligômero tem a mesma configuração estérica. Exemplos adicionais incluem os oligômeros descritos acima. Por exemplo, oligômeros à base de LNAs, ENAs, Triciclo-DNAs, MCEs, 2' O-Metila, 2' O-MOE, 2'-F e morfolino podem ser preparados com ligações entre nucleosídeos que contêm fósforo específico estéreo, tais como, por exemplo, fosforotioato, fosfodiéster, fosforamidato, fosforodiamidato ou outras ligações entre nucleosídeos que contêm fósforo. Oligômeros específicos estéreos, métodos de preparação, síntese quiral controlada, projeto quiral e auxiliares quirais para uso na preparação de tais oligômeros são detalhados, por exemplo, nos documentos nº WO2017192664, WO2017192679, WO2017062862, WO2017015575, WO2017015555, WO2015107425, WO2015108048, WO2015108046, WO2015108047, WO2012039448, WO2010064146, WO2011034072, WO2014010250, WO2014012081, WO20130127858 e WO2011005761, em que cada um está incorporado aqui a título de referência em sua totalidade.

[0141]Oligômeros específicos estéreos podem ter ligações entre nucleosídeos que contêm fósforo em uma configuração  $R_P$  ou  $S_P$ . Ligações que contêm fósforo quiral nas quais a configuração estérica das ligações é controlada são denominadas “estéreo pura”, enquanto ligações que contêm fósforo quiral nas quais a configuração

estéreo das ligações é descontrolada é denominada “estéreo aleatória”. Em determinadas modalidades, os oligômeros da divulgação compreendem uma pluralidade de ligações estéreo puras e estéreo aleatórias, de modo que o oligômero resultante tenha subunidades estéreo puras nas posições pré-especificadas do oligômero. Um exemplo da localização das subunidades estéreo puras é fornecido na Publicação de Pedido de Patente Internacional nº WO 2017/062862 A2 nas Figuras 7A e 7B. Em uma modalidade, todas as ligações que contêm fósforo quiral em um oligômero são estéreo aleatórias. Em uma modalidade, todas as ligações que contêm fósforo quiral em um oligômero são estéreo puras.

[0142]Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), em que todos os n das ligações que contêm fósforo quiral no oligômero são estéreo aleatórias. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), em que todos os n das ligações que contêm fósforo quiral no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 10% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 20% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 30% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 40% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n

ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 50% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 60% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 70% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 80% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras. Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), pelo menos 90% (até o número inteiro mais próximo) das n ligações que contêm fósforo no oligômero são estéreo puras.

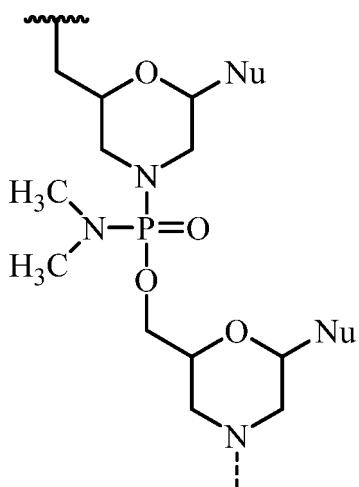
[0143]Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 2 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 3 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 4 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 5 ligações que contêm fósforo

estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 6 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 7 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 8 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 9 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 10 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 11 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 12 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que contêm fósforo quiral (em que  $n$  é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 13 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com  $n$  ligações que

contém fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 14 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 15 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 16 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 17 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 18 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 19 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ). Em uma modalidade de um oligômero com n ligações que contêm fósforo quiral (em que n é um número inteiro igual a 1 ou maior), o oligômero contém pelo menos 20 ligações que contêm fósforo estéreo puras contíguas da mesma orientação estérica (isto é,  $S_P$  ou  $R_P$ ).

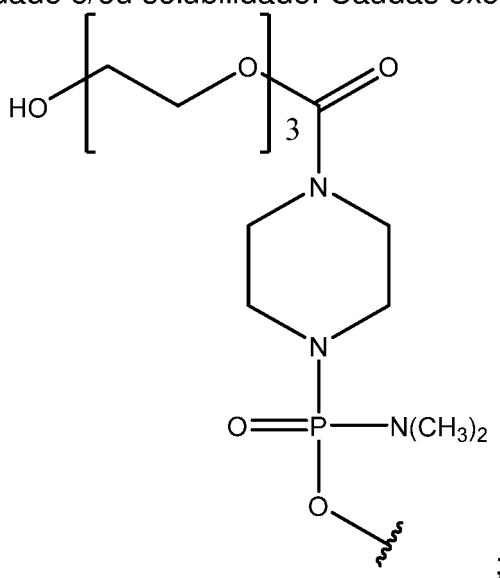
### 9. Oligômeros de Morfolino

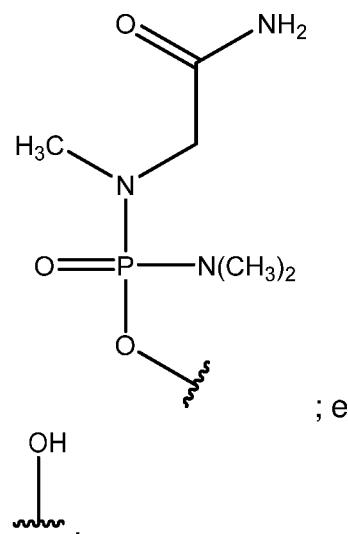
[0144]Modalidades exemplificativas da divulgação se refere a oligômeros de morfolino de fosforodiamidato da seguinte estrutura geral:



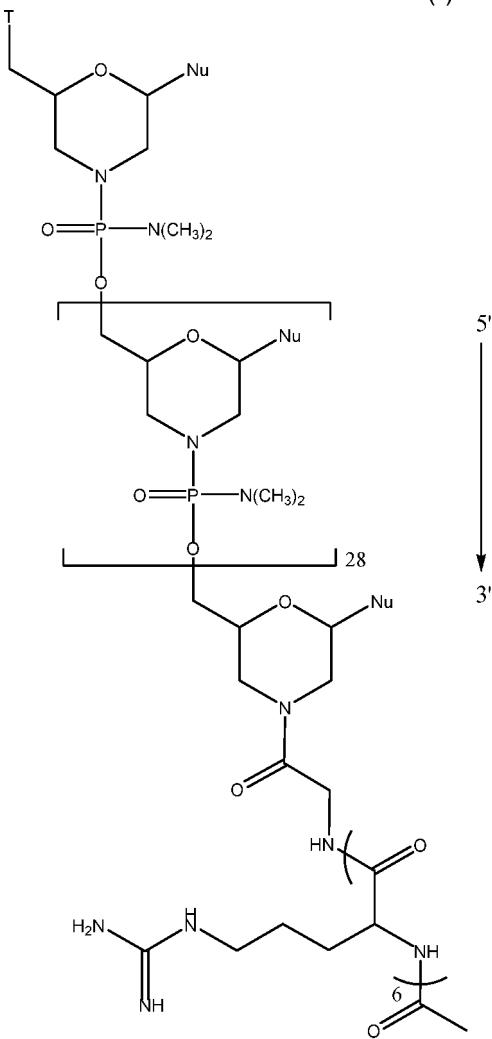
[0145] e conforme descrito na Figura 2 de Summerton, J., et al., *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, 7: 187 a 195 (1997). Morfolinos, conforme descritos no presente documento, são destinados a cobrir todos os estereoisômeros e tautômeros da estrutura geral supracitada. A síntese, as estruturas e as características de ligação de oligômeros de morfolino são detalhadas nos documentos de Patente nº U.S.: 5.698.685; 5.217.866; 5.142.047; 5.034.506; 5.166.315; 5.521.063; 5.506.337; 8.076.476; e 8.299.206, em que todos estão incorporados no presente documento a título de referência.

[0146] Em determinadas modalidades, um morfolino é conjugado na extremidade 5' ou 3' do oligômero com uma porção química de “cauda” para aumentar sua estabilidade e/ou solubilidade. Caudas exemplificativas incluem:





[0147] Em várias modalidades, um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é de acordo com a Fórmula (I):

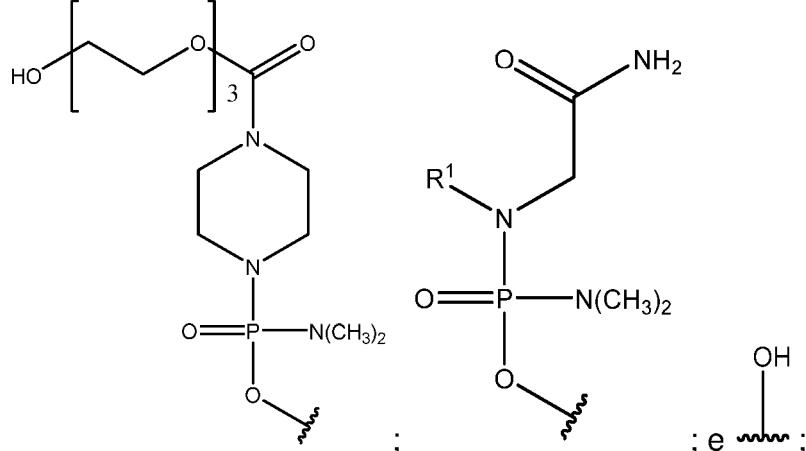


(I)

[0148]ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

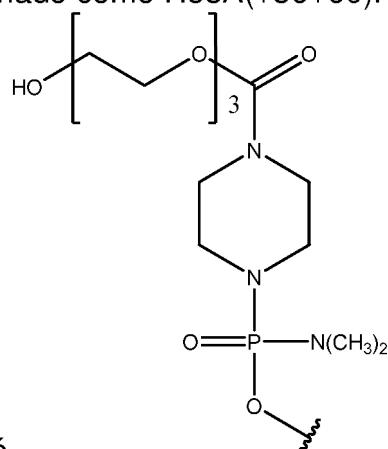
[0149]cada Nu é uma nucleobase que tomada em conjunto forma uma sequência alvo;

[0150]T é uma porção química selecionada de:



R<sup>1</sup> é C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila;

[0151]em que a sequência alvo é complementar a um sítio de anelamento de exón 53 no pré-mRNA de distrofina designado como H53A(+36+60).



[0152]Em várias modalidades, T é

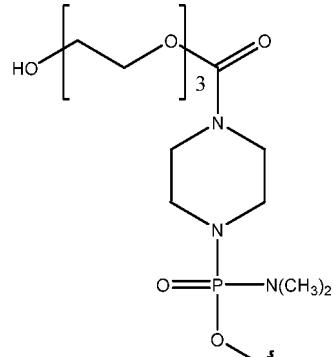
[0153]Em várias modalidades, R<sup>1</sup> é metila, CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, CFCI<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>Cl, etila, CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, propila, isopropila, butila, isobutila, sec-butila, t-butila, pentila, isopentila, neopentila, hexila, iso-hexila, 3-metilpentila, 2,2-dimetilbutila ou 2,3-dimetilbutila.

[0154]Em algumas modalidades, um conjugado de oligômero antissenso de

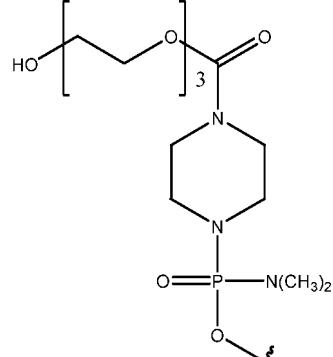
Fórmula (I) é um sal de HCl (ácido clorídrico) do mesmo. Em determinadas modalidades, o sal de HCl é um sal de .6HCl.

[0155]Em algumas modalidades, cada Nu é independentemente selecionado de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracila (U), e hipoxantina (I).

[0156]Em algumas modalidades, a sequência alvo é a SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'), em que cada timina (T) é opcionalmente uracila (U).

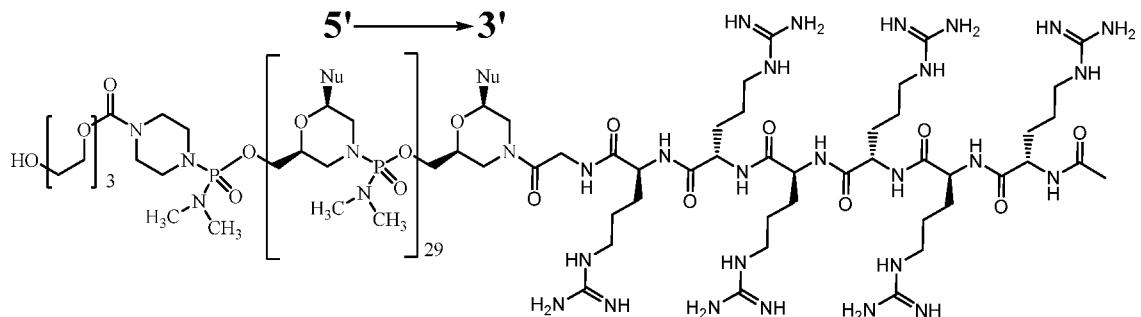


[0157]Em várias modalidades, T é , e a sequência alvo é a SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'), em que cada timina (T) é opcionalmente uracila (U).



[0158]Em várias modalidades, T é , e a sequência alvo é a SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3').

[0159]Em algumas modalidades, que incluem, por exemplo, algumas modalidades de Fórmula (I), um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é de acordo com a Fórmula (II):



(II)

[0160]ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

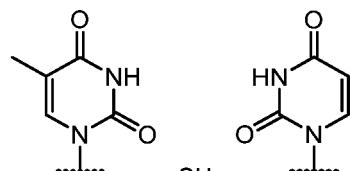
[0161]cada Nu é uma nucleobase que tida em tomada em conjunto forma uma sequência alvo que é complementar a um sítio de anelamento de exon 53 no pré-mRNA de distrofina designado como H53A(+36+60).

[0162]Em algumas modalidades, cada Nu é independentemente selecionado de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracila (U), e hipoxantina (I).

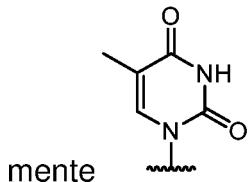
Em várias modalidades, cada Nu de 1 a 25 e 5' a 3' é (SEQ ID NO: 1):

Posição No. 5' a 3'	Nu								
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C

[0163]em que A é , C é , G é , e X é



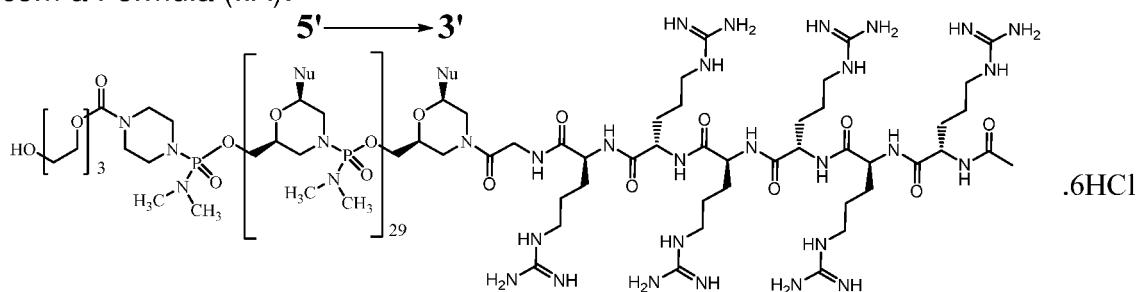
ou . Em determinadas modalidades, cada X é independentemente .



mente .

[0164]Em algumas modalidades, um conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (II) é um sal de HCl (ácido clorídrico) do mesmo. Em determinadas modalidades, o sal de HCl é um sal de .6HCl.

[0165]Em algumas modalidades, que incluem, por exemplo, algumas modalidades de Fórmula (I), um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é de acordo com a Fórmula (IIA):



(IIA)

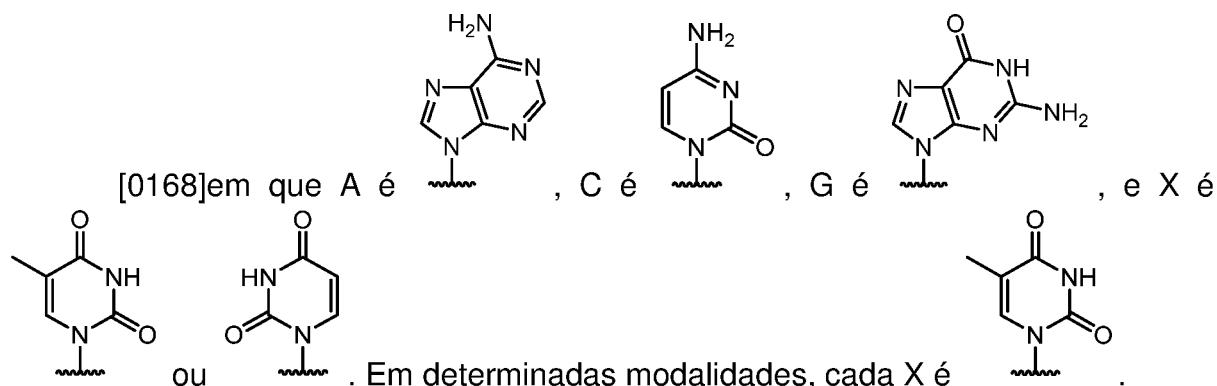
[0166]em que cada Nu é uma nucleobase que tida em tomada em conjunto forma uma sequência alvo que é complementar a um sítio de anelamento de éxon 53 no pré-mRNA de distrofina designado como H53A(+36+60).

[0167]Em algumas modalidades, cada Nu é independentemente selecionado de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracila (U), e hipoxantina (I).

Em várias modalidades, cada Nu de 1 a 25 e 5' a 3' é (SEQ ID NO: 1):

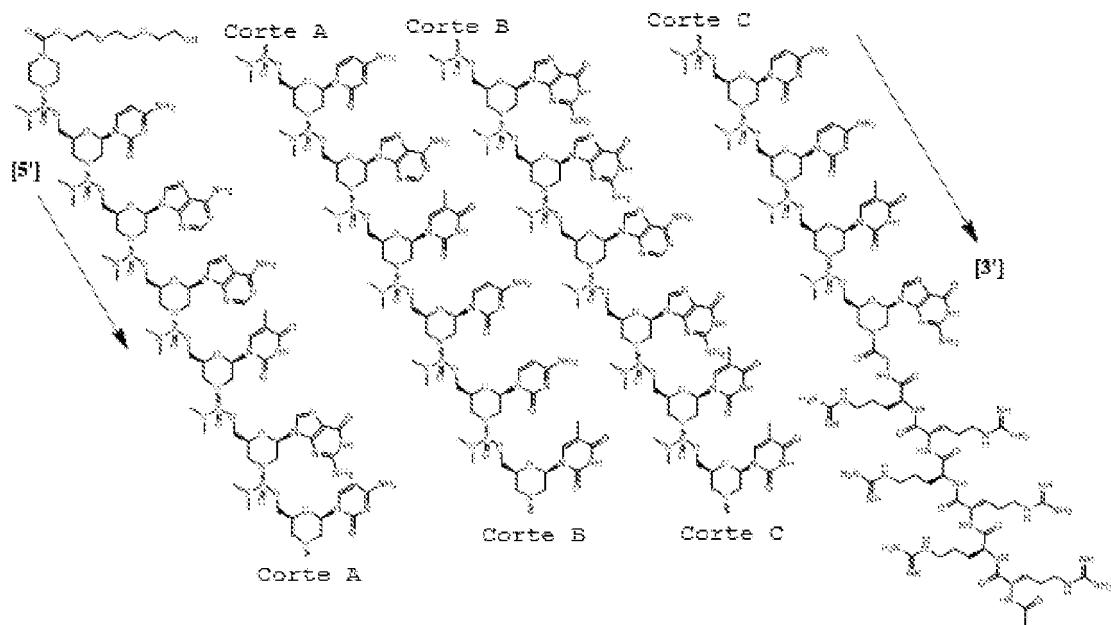
Posição No. 5' a 3'	Nu								

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



[0169]Em algumas modalidades que incluem, por exemplo, modalidades de conjugados de oligômero antissenso de Fórmula (II) e Fórmula (IIA), a sequência alvo é a SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT-3'), em que cada timina (T) é opcionalmente uracila (U). Em várias modalidades que incluem, por exemplo, modalidades de conjugados de oligômero antissenso de Fórmula (II) e Fórmula (IIA), a sequência alvo é a SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT-3').

[0170]Em algumas modalidades, que incluem, por exemplo, modalidades de conjugados de oligômero antissenso de Fórmula (I), um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é de acordo com a Fórmula (III):

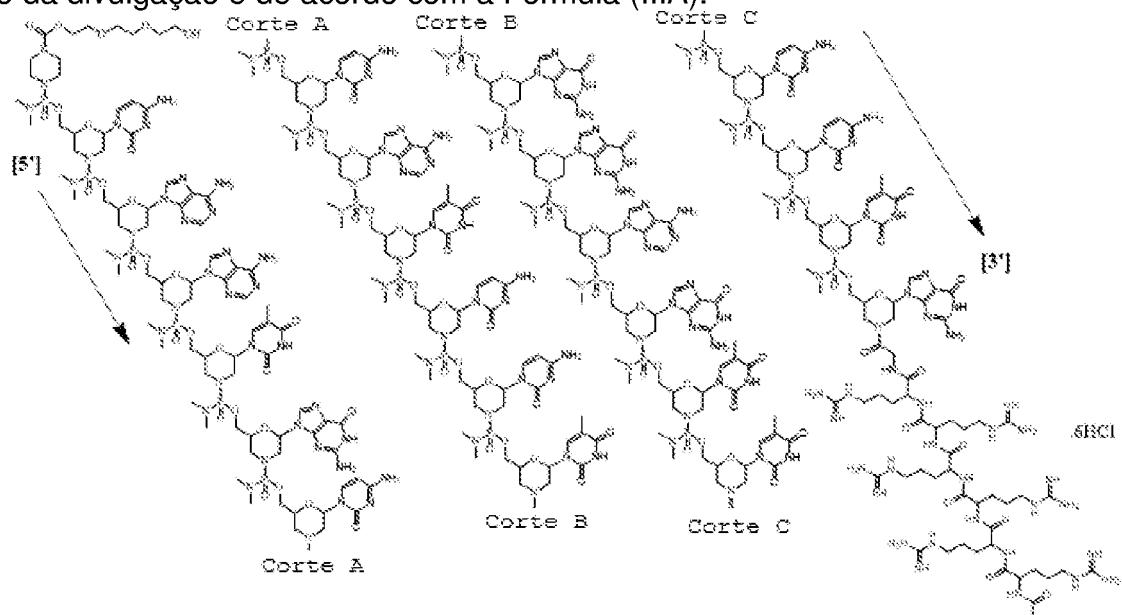


(III)

[0171]ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

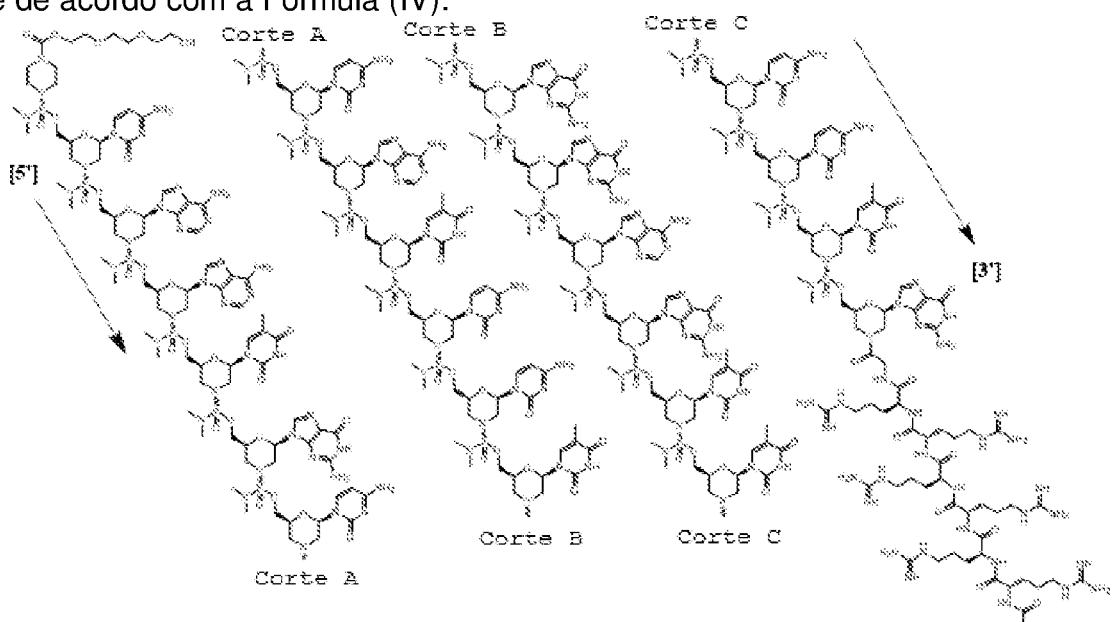
[0172]Em algumas modalidades, um conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é um sal de HCl (ácido clorídrico) do mesmo. Em determinadas modalidades, o sal de HCl é um sal de .6HCl.

[0173]Em algumas modalidades, que incluem, por exemplo, modalidades de conjugados de oligômero antissenso de Fórmula (III), um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é de acordo com a Fórmula (IIIA):



(IIIA).

[0174] Em algumas modalidades da divulgação, que incluem algumas modalidades de conjugados de oligômero antissenso de Fórmula (I) e modalidades de conjugados de oligômero antissenso de Fórmula (III), o conjugado de oligômero antissenso é de acordo com a Fórmula (IV):

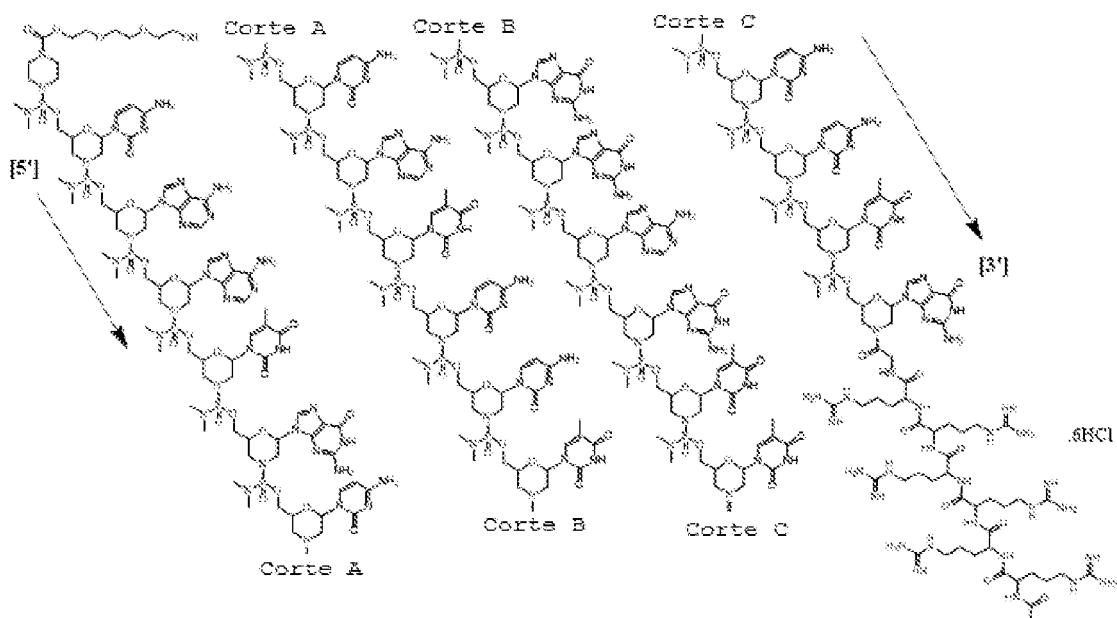


(IV)

[0175] ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

[0176] Em algumas modalidades, um conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (IV) é um sal de HCl (ácido clorídrico) do mesmo. Em determinadas modalidades, o sal de HCl é um sal de .6HCl.

[0177] Em algumas modalidades, que incluem, por exemplo, modalidades de conjugados de oligômero antissenso de Fórmula (IV), um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é de acordo com a Fórmula (IVA):



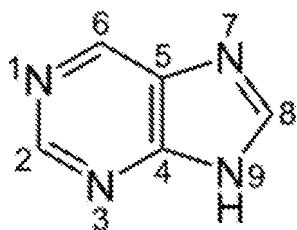
(IVA).

#### 10. Modificações e Substituições de Nucleobase

[0178] Em determinadas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso da divulgação são compostos por nucleobases de RNA e nucleobases de DNA (frequentemente denominadas na técnica simplesmente “base”). Bases de RNA são normalmente conhecidas como adenina (A), uracila (U), citosina (C) e guanina (G). Bases de DNA são normalmente conhecidas como adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G). Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso da divulgação são compostos por citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracila (U) e hipoxantina (I).

[0179] Em determinadas modalidades, uma ou mais bases de RNA ou bases de DNA em um oligômero podem ser modificadas ou substituídas por uma base diferente de uma base de RNA ou base de DNA. Oligômeros que contêm uma base modificada ou substituída incluem oligômeros nos quais uma ou mais bases de purina ou pirimidina encontradas mais normalmente em ácidos nucleicos são substituídas por bases menos comuns ou não naturais.

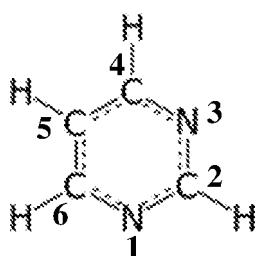
[0180] Bases de purina compreendem um anel de pirimidina fundido a um anel de imidazol, conforme descrito pela seguinte Fórmula geral.



Purina

[0181] Adenina e guanina são as duas nucleobases de purina encontradas mais normalmente em ácidos nucleicos. Outras purinas de ocorrência natural incluem, porém, sem limitação, N<sup>6</sup>-metiladenina, N<sup>2</sup>-metilguanina, hipoxantina e 7-metilguanina.

[0182] Bases de pirimidina compreendem um anel de pirimidina com seis membros conforme descrito pela seguinte Fórmula geral.



Pirimidina

[0183] Citosina, uracila e timina são as bases de pirimidina encontradas mais normalmente em ácidos nucleicos. Outras pirimidinas de ocorrência natural incluem, porém, sem limitação, 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, pseudouracila e 4-tiouracila. Em uma modalidade, os oligômeros descritos no presente documento contêm bases de timina no lugar de uracila.

[0184] Outras bases adequadas incluem, porém, sem limitação: 2,6-diaminopurina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidinas (por exemplo, 2-tiouracila, 2-tiotimina), G-clamp e seus derivados, pirimidinas 5-substituídas (por exemplo, 5-hiouracila, 5-propiniluracila, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracila, 5-hidroximetiluracila, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2,6-diaminopurina, Super G, Super A, e N4-etilcitosina ou derivados

dos mesmos; N<sup>2</sup>-ciclopentilguanina (cPent-G), N<sup>2</sup>-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) e N<sup>2</sup>-propil-2-aminopurina (Pr-AP), pseudouracila ou derivados dos mesmos; e degenerado ou bases universais, como 2,6-difluorotolueno ou bases ausentes como sítios abásicos (por exemplo, 1-desoxirribose, 1,2-didesoxirribose, L-desoxi-2-O-metilribose; ou derivados de pirrolidina nos quais o anel de oxigênio foi substituído por nitrogênio (azarribose)). Exemplos de derivados de Super A, Super G e Super T podem ser encontrados no documento de Patente nº U.S. 6.683.173 (Epoch Biosciences), que está incorporado aqui inteiramente a título de referência. cPent-G, cPent-AP, e Pr-AP reduziram os efeitos imunoestimuladores quando incorporados em siRNA (Peacock H. et al., J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 9.200). Pseudouracila é uma versão isomerizada de ocorrência natural da uracila, com um glicosídeo C em vez do glicosídeo N regular como em uridina. mRNA sintético que contém pseudouridina pode ter um perfil de segurança melhorado em comparação com mPvNA que contém uridina (WO 2009127230, incorporado aqui em sua totalidade a título de referência).

[0185] Determinadas nucleobases são particularmente úteis para aumentar a afinidade de ligação dos conjugados de oligômero antissenso da divulgação. Essas incluem pirimidinas 5-substituídas, 6-azapirimidinas e purinas N-2, N-6 e O-6 substituídas, que incluem 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracila e 5-propinilcitosina. Substituições de 5-metilcitosina aumentaram a estabilidade de duplex ácido nucleico em 0,6 a 1,2 °C e são, atualmente, substituições de base preferenciais, ainda mais particularmente quando combinadas com modificações de açúcar de 2'-O-metoxietila. Nucleobases modificadas exemplificativas adicionais incluem aquelas em que pelo menos um átomo de hidrogênio da nucleobase é substituído por flúor.

#### 11. Sais Farmaceuticamente Aceitáveis de Conjugados de Oligômero Antissenso

[0186] Determinadas modalidades de conjugados de oligômero antissenso descritas no presente documento podem conter um grupo funcional básico, tal como

amino ou alquilamino e, assim, têm capacidade para formar sais farmaceuticamente aceitáveis com ácidos farmaceuticamente aceitáveis. O termo “sais farmaceuticamente aceitáveis” a esse respeito, se refere aos sais de adição de ácido inorgânico e orgânico relativamente não tóxicos de conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação. Esses sais podem ser preparados *in situ* no veículo de administração ou no processo de fabricação de forma de dosagem, ou reagindo-se separadamente um conjugado de oligômero antissenso purificado da divulgação em sua forma de base livre com um ácido orgânico ou inorgânico adequado, e isolando-se o sal assim formado durante purificação subsequente. Sais representativos incluem os sais de bromidrato, cloridrato, sulfato, bissulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glicoepetonato, lactobionato e laurilsulfonato e semelhantes. (Consultar, por exemplo, Berge *et al.* (1977) “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66: 1 a 19).

[0187]Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos conjugados de oligômero antissenso individuais incluem os sais não tóxicos convencionais ou sais de amônia quaternária dos conjugados de oligômero antissenso, por exemplo, dos ácidos orgânicos ou inorgânicos não tóxicos. Por exemplo, tais sais não tóxicos convencionais incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos, tais como clorídrico, bromídrico, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico e semelhantes; e os sais preparados dentre ácidos orgânicos, tais como ácido acético, propiônico, succínico, glicólico, esteárico, lático, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenossulfônico, metanossulfônico, etanodissulfônico, oxálico, isotiônico e semelhantes.

[0188]Em determinadas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação podem conter um ou mais grupos funcionais ácidos e, assim,

têm capacidade para formar sais farmaceuticamente aceitáveis com bases farmaceuticamente aceitáveis. O termo “sais farmaceuticamente aceitáveis” nesses casos se referem aos sais de adição de base inorgânica e orgânica relativamente não tóxicos de conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação. Esses sais podem ser, da mesma forma, preparados *in situ* no veículo de administração ou no processo de fabricação de forma de dosagem, ou reagindo-se separadamente o conjugado de oligômero antissenso purificado em sua forma de ácido livre com uma base adequada, tal como o hidróxido, carbonato ou bicarbonato de um cátion de metal farmaceuticamente aceitável, com amônia, ou com uma amina primária, secundária ou terciária orgânica farmaceuticamente aceitável. Sais alcalinos ou alcalinos terrosos representativos incluem os sais de lítio, sódio, potássio, cálcio, magnésio, e alumínio e semelhantes. Aminas orgânicas representativas úteis para a formação de sais de adição de base incluem etilamina, dietilamina, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina e semelhantes. (Consultar, por exemplo, Berge *et al.*, *supra*).

### III. Formulações e Modos de Administração

[0189]Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece formulações ou composições farmacêuticas adequadas para a entrega terapêutica de conjugados de oligômero antissenso, conforme descrito no presente documento. Portanto, em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece composições farmaceuticamente aceitáveis que compreendem uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais dentre os conjugados de oligômero antissenso descritos no presente documento, formulados juntamente com um ou mais carreadores farmaceuticamente aceitáveis (aditivos) e/ou diluentes. Embora seja possível que um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação seja administrado sozinho, é preferencial administrar o conjugado de oligômero antissenso como uma formulação farmacêutica (composição). Em uma modalidade, o conjugado de oligômero antissenso da formulação é de acordo com a Fórmula (III).

[0190]Métodos para a entrega de moléculas de ácido nucleico, que podem ser aplicáveis nos conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação, são descritos, por exemplo, em: Akhtar *et al.*, 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, edição Akhtar, 1995, CRC Press; e Sullivan *et al.*, PCT WO 94/02595. Esses e outros protocolos podem ser utilizados para a entrega de virtualmente qualquer molécula de ácido nucleico, que inclui os conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação.

[0191]As composições farmacêuticas da presente divulgação podem ser especialmente formuladas para administração em forma sólida ou líquida, que inclui aquelas adaptadas para o seguinte: (1) administração oral, por exemplo, pulverizações de água (soluções ou suspensões aquosas ou não aquosas), comprimidos (alvejados para absorção bucal, sublingual ou sistêmica), bolus, pós, grânulos, pastas para aplicação na língua; (2) administração parenteral, por exemplo, através de injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou epidural como, por exemplo, uma solução ou suspensão estéril, ou formulação de liberação prolongada; (3) aplicação tópica, por exemplo, como um creme, pomada ou um adesivo de liberação controlada ou aspersão aplicada na pele; (4) por via intravaginal ou intrarretal, por exemplo, como um pessário, creme ou espuma; (5) por via sublingual; (6) por via ocular; (7) por via transdérmica; ou (8) por via nasal.

[0192]Alguns exemplos de materiais que podem servir como carreadores farmaceuticamente aceitáveis incluem, sem limitação: (1) açúcares, tais como lactose, glicose e sacarose; (2) amidos, tais como amido de milho e amido de batata; (3) celulose, e seus derivados, tais como carboximetilcelulose de sódio, etilcelulose e acetato de celulose; (4) agradante em pó; (5) malte; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tais como manteiga de cacau e ceras supositórias; (9) óleos, tais como óleo de amendoim, óleo de semente de algodão, óleo de cártamo, óleo de sésamo, óleo de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tais como propilenoglicol; (11) polióis, tais como

glicerina, sorbitol, manitol, e polietilenoglicol; (12) ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila; (13) ágar; (14) agentes tamponantes, tais como hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio; (15) ácido algínico; (16) água livre de pirogênio; (17) solução salina isotônica; (18) solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) soluções de pH tamponado; (21) poliésteres, policarbonatos e/ou polianidridos; e (22) outras substâncias compatíveis não tóxicas empregadas em formulações farmacêuticas.

[0193] Exemplos sem limitação adicionais de agentes adequados para formulação com os conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação incluem: ácidos nucleicos de PEG conjugado; ácidos nucleicos de fosfolipídio conjugado; ácidos nucleicos que contêm porções químicas lipofílicas; fosforotioatos; inibidores de P-glicoproteína (tais como Pluronic P85) que pode aprimorar a entrada de fármacos em vários tecidos; polímeros biodegradáveis, tais como microesferas de poli(D,L-lactídeocoglicólido) para entrega de liberação prolongada após implantação (Emerich, D F *et al.*, 1999, *Cell Transplant*, 8, 47 a 58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; e nanopartículas carregadas, tais como aquelas produzidas a partir de polibutilcianoacrilato, que podem entregar fármacos através da barreira hematoencefálica e podem alterar os mecanismos de absorção neuronal (*Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 23, 941 a 949, 1999).

[0194] A divulgação também apresenta o uso da composição que compreende lipossomas de superfície modificada que contêm lipídios de poli(etilenoglicol) (“PEG”) (PEG modificado, ramificado e não ramificado ou combinações dos mesmos, ou lipossomas de longa circulação ou lipossomas furtivos). Conjugados de oligômero da divulgação também podem compreender moléculas de PEG covalentemente ligadas de vários pesos moleculares. Essas formulações oferecem um método para aumentar a acumulação de fármacos em tecidos alvo. Essa classe de carreadores de fármaco resiste à opsonização e eliminação pelo sistema fagocítico mononuclear (MPS ou

RES), desse modo, se permite tempos de circulação sanguínea mais longos e exposição de tecido aprimorada para o fármaco encapsulado (Lasic *et al.* Chem. Rev. 1995, 95, 2.601 a 2.627; Ishiwata *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1.005 a 1.011). Tais lipossomas se acumularam seletivamente em tumores, presumivelmente através do extravasamento e captura nos tecidos alvo neovascularizados (Lasic *et al.*, Science 1995, 267, 1.275 a 1.276; Oku *et al.*, 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1.238, 86 a 90). Os lipossomas de longa circulação aprimoram a farmacocinética e farmacodinâmica de DNA e RNA, particularmente em comparação com lipossomas catiônicos convencionais que são conhecidos por se acumularem em tecidos do MPS (Liu *et al.*, J. Biol. Chem. 1995, 42, 24.864 a 24.870; Choi *et al.*, Publicação PCT Internacional nº WO 96/10391; Ansell *et al.*, Publicação PCT Internacional nº WO 96/10390; Holland *et al.*, Publicação PCT Internacional nº WO 96/10392). Os lipossomas de longa circulação também são propensos a proteger fármacos da degradação de nuclease em um grau maior em comparação com lipossomas catiônicos, com base em sua capacidade em evitar a acumulação em tecidos de MPS metabolicamente agressivos, tais como o fígado e baço.

[0195]Em uma modalidade adicional, a presente divulgação inclui composições farmacêuticas de conjugado de oligômero antissenso preparadas para entrega, conforme descrito nos documentos de Patente nº U.S.: 6.692.911; 7.163.695; e 7.070.807. Com relação a isso, em uma modalidade, a presente divulgação fornece um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação em uma composição que compreende copolímeros de lisina e histidina (HK) (conforme descrito nos documentos de Patente nº U.S.: 7.163.695; 7.070.807; e 6.692.911) sejam sozinhos ou em combinação com PEG (por exemplo, PEG ramificado ou não ramificado ou uma mistura de ambos), em combinação com PEG e uma porção química de alvejamento, ou qualquer um dos supracitados em combinação com um agente de reticulação. Em determinadas modalidades, a presente divulgação fornece conjugados de oligômero

antissenso em composições farmacêuticas que compreendem poli-histidina modificada com ácido glucônico ou poli-histidina gliconilada/polilisina de transferrina. Uma pessoa versada na técnica também reconhecerá que aminoácidos com propriedades similares a His e Lys podem ser substituídos dentro da composição.

[0196]Agentes umectantes, emulsificantes e lubrificantes (tais como sulfato de laurila de sódio e estearato de magnésio), agentes corantes, agentes de liberação, agentes de revestimento, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, agentes perfumantes, conservantes e antioxidantes também podem estar presentes nas composições.

[0197]Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tal como ácido ascórbico, cloridrato de cisteína, bisulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e semelhantes; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tal como palmitato de ascorbila, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilgalato, alfa-tocoferol e semelhantes; e (3) agentes quelantes de metal, tal como ácido cítrico, ácido tetra-acético de etilenodiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico e semelhantes.

[0198]Formulações da presente divulgação incluem aquelas adequadas para administração oral, nasal, tópica (que inclui bucal e sublingual), retal, vaginal e/ou parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem em unidade e podem ser preparadas por meio de qualquer um dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material de carreador para produzir uma única forma de dosagem variará dependendo do indivíduo que é tratado e do modo particular de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material de carreador para produzir uma única forma de dosagem será, de modo geral, aquela quantidade do ingrediente ativo que produz um efeito terapêutico. De modo geral, essa quantidade estará na faixa de cerca de 0,1 por cento a cerca de noventa e nove

por cento de ingrediente ativo, preferencialmente de cerca de 5 por cento a cerca de 70 por cento, com máxima preferência de cerca de 10 por cento a cerca de 30 por cento.

[0199]Em determinadas modalidades, uma formulação da presente divulgação comprehende um excipiente selecionado a partir de ciclodextrinas, celuloses, liposomas, agentes de formação de micela, por exemplo, ácidos biliares, e carreadores poliméricos, por exemplo, poliésteres e polianidridos; e um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação. Em uma modalidade, o conjugado de oligômero antissenso da formulação é de acordo com a Fórmula (III). Em determinadas modalidades, uma formulação mencionada acima rende de maneira oralmente biodisponível um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação.

[0200]Métodos para preparar essas formulações ou composições farmacêuticas incluem a etapa de ligar em associação um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação com o carreador e, opcionalmente, um ou mais ingredientes auxiliares. Em geral, as formulações são preparadas ligando-se uniforme e intimamente em associação um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação com carreadores líquidos, ou carreadores sólidos finamente divididos, ou ambos e, então, caso necessário, conformando-se o produto.

[0201]Formulações da divulgação adequadas para administração oral podem estar na forma de cápsulas, hóstias, pílulas, comprimidos, drágeas (com o uso de uma base saborizada, normalmente sacarose e acácia ou agradante), pó, grânulos, ou como uma solução ou uma suspensão em um líquido aquoso ou não aquoso, ou como uma emulsão líquida de óleo em água ou água em óleo, ou como um elixir ou xarope, ou como pastilhas (com o uso de uma base inerte, tal como gelatina e glicerina, ou sacarose e acácia) e/ou como enxaguantes e semelhantes, em que cada um contém uma quantidade predeterminada de um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação como um ingrediente ativo. Um conjugado de oligômero antissenso

da presente divulgação também pode ser administrado como um bolo, eleituário ou pasta.

[0202]Em formas de dosagem sólidas da divulgação para administração oral (cápsulas, comprimidos, pílulas, drágeas, pós, grânulos, trouxas e semelhantes), o ingrediente ativo pode ser misturado com um ou mais carreadores farmaceuticamente aceitáveis, tais como citrato de sódio ou fosfato dicálcico, e/ou qualquer um dos seguintes: (1) cargas ou extensores, tais como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol e/ou ácido silícico; (2) ligantes, tais como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose e/ou acácia; (3) umectantes, tal como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tais como ágar-ágár, carbonato de cálcio, amido de batata ou tapioca, ácido algínico, determinados silicatos, e carbonato de sódio; (5) agentes retardantes de solução, tal como parafina; (6) aceleradores de absorção, tais como compostos de amônia quaternária e tensoativos, tais como poloxâmero e sulfato de laurila de sódio; (7) agentes umectantes, tais como, por exemplo, álcool cetílico, monostearato de glicerol, e tensoativos não iônicos; (8) absorventes, tais como caulim e argila de bentonita; (9) lubrificantes, tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietilenoglicóis sólidos, sulfato de laurila de sódio, estearato de zinco, estearato de sódio, ácido esteárico e misturas dos mesmos; (10) agentes corantes; e (11) agentes de liberação controlada, tais como crospovidona ou etilcelulose. No caso de cápsulas, comprimidos e pílulas, as composições farmacêuticas também podem compreender agentes tamponantes. Composições farmacêuticas sólidas de um tipo similar também podem ser empregadas como cargas em cápsulas de gelatina de invólucro macio e duro com o uso de tais excipientes como lactose ou açúcares de leite, assim como polietilenoglicóis de alto peso molecular e semelhantes.

[0203]Um comprimido pode ser produzido por meio de compressão ou moldagem, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessórios. Comprimidos com-

primidos podem ser preparados com o uso de ligante (por exemplo, gelatina ou hidroxipilmetylcelulose), lubrificante, diluente inerte, conservante, desintegrante (por exemplo, glicolato de amido de sódio ou carboximetilcelulose de sódio reticulado), agente de distribuição ou ativo em superfície. Comprimidos moldado pode ser produzido moldando-se em uma máquina adequada uma mistura do composto em pó úmido com um diluente líquido inerte.

[0204]Os comprimidos, e outras formas de dosagem sólidas das composições farmacêuticas da presente divulgação, tais como drágeas, cápsulas, pílulas e grânulos, podem ser opcionalmente classificadas ou preparadas com revestimentos e invólucros, tais como revestimentos entéricos e outros revestimentos bem conhecidos na técnica de formulação farmacêutica. Os mesmos também podem ser formulados de modo a fornecer liberação lenta ou controlada do ingrediente ativo nos mesmos com o uso, por exemplo, de hidroxipilmetylcelulose em proporções variantes para fornecer o perfil de liberação desejado, outras matrizes poliméricas, lipossomas e/ou microesferas. Os mesmos podem ser formulados para liberação rápida, por exemplo, liofilizados. Os mesmos podem ser esterilizados, por exemplo, através de filtração através de um filtro de retenção de bactérias, ou incorporando-se agentes esterilizantes na forma de composições farmacêuticas sólidas estéreis que podem ser dissolvidas em água estéril, ou alguns outros meios injetáveis estéreis imediatamente antes do uso. Essas composições farmacêuticas também podem conter, opcionalmente, agentes opacificantes e podem ser de uma composição em que liberam o ingrediente ativo (ou ingredientes ativos) apenas, ou preferencialmente, em uma determinada porção do trato gastrointestinal, opcionalmente, de uma maneira atrasada. Exemplos de composições de integração que podem ser usadas incluem substâncias e ceras poliméricas. O ingrediente ativo também pode estar em forma microencapsulada, caso seja apropriado, com um ou mais dentre os excipientes descritos acima.

[0205]Formas de dosagem líquida para administração oral dos conjugados de

oligômero antissenso da divulgação incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires farmaceuticamente aceitáveis. Adicionalmente ao ingrediente ativo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes normalmente usados na técnica, tal como, por exemplo, água ou outros solventes, agentes solubilizantes e emulsificantes, tais como álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propilenoglicol, 1,3-butilenoglicol, óleos (em particular, óleos de semente de algodão, amendoim, milho, germe, oliva, rícino e sésamo), glicerol, álcool tetra-hidrofurílico, polietilenoglicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitana e misturas dos mesmos.

[0206]Além de diluentes inertes, as composições farmacêuticas orais também podem incluir adjuvantes, tais como agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, agentes edulcorantes, saborizantes, corantes, perfumantes e conservantes.

[0207]Suspensões, adicionalmente aos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão como, por exemplo, álcoois isostearílicos etoxilados, sorbitol de polioxietíleno e ésteres de sorbitana, celulose microcristalina, meta-hidróxido de alumínio, bentonita, ágar-ágár e agradante, e misturas dos mesmos.

[0208]Formulações para administração retal ou vaginal podem ser apresentadas como um supositório, que pode ser preparado misturando-se um ou mais compostos da divulgação com um ou mais excipientes ou carreadores não irritantes adequados que compreendem, por exemplo, manteiga de cacau, polietilenoglicol, uma cera supositória ou um salicilato, e que é sólido em temperatura ambiente, porém, líquido em temperatura corporal e, portanto, derreterá no reto ou cavidade vaginal e liberará o composto ativo.

[0209]Formulações ou formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica de um oligômero, conforme fornecido no presente documento, incluem

pós, pulverizações, pomadas, pastas, cremes, loções, géis, soluções, adesivos e inalantes. Os conjugados de oligômero ativo podem ser misturados sob condições estéreis com um carreador farmaceuticamente aceitável, e com qualquer conservante, tampão ou propulsor que possa ser necessário. As pomadas, pastas, cremes e géis podem conter, adicionalmente a um composto ativo dessa divulgação, excipientes, tais como gorduras animal e vegetal, óleos, ceras, parafinas, amido, agradante, derivados de celulose, polietilenoglicóis, silicones, bentonitas, ácido silícico, óxido de talco e zinco, ou misturas dos mesmos.

[0210]Pós e aspersões podem conter, adicionalmente a um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação, excipientes, tais como lactose, talco, ácido silícico, hidróxido de alumínio, silicatos de cálcio e pó de poliamida, ou misturas dessas substâncias. Aaspersões podem conter, adicionalmente, propulsores tradicionais, tais como clorofluoro-hidrocarbonetos e hidrocarbonetos não substituídos voláteis, tais como butano e propano.

[0211]Adesivos transdérmicos têm a vantagem adicional de fornecer entrega controlada de um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação ao corpo. Tais formas de dosagem podem ser produzidas dissolvendo ou distribuindo-se o oligômero no meio apropriado. Aprimadores de absorção também podem ser usados para aumentar o fluxo do agente através da pele. A taxa de tal fluxo pode ser controlada fornecendo-se uma membrana de controle de taxa ou distribuindo-se o agente em uma matriz polimérica ou gel, dentre outros métodos conhecidos na técnica.

[0212]Composições farmacêuticas adequadas para administração parentérica podem compreender um ou mais conjugados de oligômero da divulgação em combinação com uma ou mais soluções aquosas ou não aquosas isotônicas estéreis farmaceuticamente aceitáveis, dispersões, suspensões ou emulsões, ou pós estéreis que podem ser reconstituídos em soluções ou dispersões injetáveis estéreis pouco

antes do uso, que podem conter açúcares, álcoois, antioxidantes, tampões, bacterios-  
tatos, solutos que rendem a formulação isotônica com o sangue do recipiente ou agen-  
tes de suspensão ou espessantes destinados. Exemplos de carreadores aquosos e  
não aquosos adequados que podem ser empregados nas composições farmacêuticas  
da divulgação incluem água, etanol, polióis (tal como glicerol, propilenoglicol, polieti-  
lenoglicol e semelhantes), e misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais, tais  
como óleo de oliva, e ésteres orgânicos injetáveis, tal como oleato de etila. Fluidez  
apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento tal  
como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula exigido no caso de disper-  
sões e pelo uso de tensoativos. Em uma modalidade, o conjugado de oligômero an-  
tissenso da composição farmacêutica é de acordo com a Fórmula (III).

[0213]Essas composições farmacêuticas também podem conter adjuvantes,  
tais como conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes e agentes dis-  
persantes. A prevenção da ação de micro-organismos sobre os conjugados de oligô-  
mero individuais pode ser garantida pela inclusão de vários agentes antibacterianos e  
antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico e semelhan-  
tes. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, clo-  
reto de sódio e semelhantes, nas composições. Adicionalmente, absorção prolongada  
da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que  
atrasam a absorção, tal como monoestearato de alumínio e gelatina.

[0214]Em alguns casos, de modo a prolongar o efeito de um fármaco, é dese-  
jável retardar a absorção do fármaco a partir de injeção subcutânea ou intramuscular.  
Isso pode ser realizado através do uso de uma suspensão líquida de material cristalino  
ou amorfo que tem pouca solubilidade em água, dentre outros métodos conhecidos  
na técnica. A taxa de absorção do fármaco depende, então, de sua taxa de dissolução  
que, por sua vez, pode depender do tamanho de cristal e forma cristalina. Alternativa-  
mente, a absorção atrasada de uma forma de fármaco administrada por via parental

é realizada dissolvendo ou suspendendo-se o fármaco em um veículo oleoso.

[0215]Formas de depósito injetáveis podem ser produzidas formando-se matrizes de microcápsulas dos conjugados de oligômero individuais em polímeros biodegradáveis, tais como polilactídeo-poliglicólido. Dependendo da razão de oligômero para polímero e a natureza do polímero particular empregado, a razão de liberação de oligômero pode ser controlada. Exemplos de outros polímeros biodegradáveis incluem poli(ortho-ésteres) e poli(anidridos). Formulações injetáveis de depósito também podem ser preparadas encapsulando-se a droga em lipossomos ou microemulsões que são compatíveis com tecidos corporais.

[0216]Quando os conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação são administrados como produtos farmacêuticos, a seres humanos e animais, os mesmos podem ser dados *per se* ou como uma composição farmacêutica que contém, por exemplo, de 0,1 a 99% (mais preferencialmente, de 10 a 30%) do conjugado de oligômero antissenso em combinação com um carreador farmaceuticamente aceitável.

[0217]As formulações ou preparações da presente divulgação podem ser dadas por via oral, parenteral, tópica ou retal. As mesmas são tipicamente dadas em formas adequadas para cada rota de administração. Por exemplo, são administradas em forma de comprimidos ou cápsula, através de injeção, inalação, loção para o olho, pomada, supositório, ou infusão; tópicamente através de loção ou pomada; ou por via retal através de supositórios.

[0218]Independentemente da rota de administração selecionada, os conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação, que podem ser usados em uma forma hidratada adequada, e/ou as composições farmacêuticas da presente divulgação, podem ser formuladas em formas de dosagem farmaceuticamente aceitáveis através de métodos convencionais conhecidos por aqueles versados na técnica. Níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas desta

divulgação podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para obter a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição e modo de administração particular, sem que seja inaceitavelmente tóxico ao paciente.

[0219]O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores que incluem a atividade do conjugado de oligômero antissenso particular da presente divulgação empregado, ou o éster, sal ou amida do mesmo, a rota de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção ou metabolismo do oligômero particular que é empregado, a taxa e grau de absorção, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com o oligômero particular empregado, a idade, sexo, peso, afecção, saúde geral e histórico médico antecedente do paciente que é tratado, e fatores semelhantes bem conhecidos nas técnicas médicas.

[0220]Um médico ou veterinário que tem habilidade comum na técnica pode determinar e prescrever prontamente a quantidade eficaz da composição farmacêutica necessária. Por exemplo, o médico ou veterinário poderia iniciar as doses dos conjugados de oligômero antissenso da divulgação empregadas na composição farmacêutica em níveis inferiores àqueles necessários de modo a obter o efeito terapêutico desejado e aumenta gradualmente a dosagem até que o efeito desejado seja alcançado. Em geral, uma dose diária adequada de um conjugado de oligômero antissenso da divulgação será aquela quantidade do conjugado de oligômero antissenso que é a menor dose eficaz para produzir um efeito terapêutico. Tal dose eficaz dependerá, de modo geral, dos fatores descritos no presente documento. De modo geral, doses oral, intravenosa, intracerebroventricular e subcutânea dos conjugados de oligômero antissenso desta divulgação para um paciente, quando usadas para os efeitos indicados, estarão na faixa de cerca de 0,0001 a cerca de 100 mg por quilograma de peso corporal por dia.

[0221]Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso da presente divulgação são administrados em doses, de modo geral, de cerca de 10 a 160 mg/kg ou 20 a 160 mg/kg. Em alguns casos, doses maiores que 160 mg/kg podem ser necessárias. Em algumas modalidades, doses para administração i.v. São de cerca de 0,5 mg a 160 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados em doses de cerca de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg ou 10 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados em doses de cerca de 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, que incluem todos os números inteiros entre os mesmos. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 10 mg/kg. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 20 mg/kg. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 30 mg/kg. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 40 mg/kg. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 60 mg/kg. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 80 mg/kg. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 160 mg/kg. Em algumas modalidades, o oligômero é administrado a 50 mg/kg.

[0222]Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado em doses, de modo geral, de cerca de 10 a 160 mg/kg ou

20 a 160 mg/kg. Em algumas modalidades, doses do conjugado de oligômero antisenso de Fórmula (III) para administração i.v. são de cerca de 0,5 mg a 160 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado em doses de cerca de 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg ou 10 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado em doses de cerca de 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg, 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, que incluem todos os números inteiros entre os mesmos. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 10 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 20 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 30 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 40 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 60 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 80 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 160 mg/kg. Em algumas modalidades, o conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (III) é administrado a 50 mg/kg.

[0223]Caso seja desejado, a dose diária eficaz do composto ativo pode ser

administrada como dois, três, quatro, cinco, seis ou mais subdoses administradas separadamente em intervalos apropriados ao longo do dia, opcionalmente, em formas de dosagem unitária. Em determinadas situações, a dosagem é uma administração por dia. Em determinadas modalidades, a dosagem é uma ou mais administrações a cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 dias, ou a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas, ou a cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, conforme necessário, para manter a expressão desejada de uma proteína de distrofina funcional. Em determinadas modalidades, a dosagem é uma ou mais administrações uma vez a cada duas semanas. Em algumas modalidades, a dosagem é uma administração a cada duas semanas. Em várias modalidades, a dosagem é uma ou mais administrações a cada mês. Em determinadas modalidades, a dosagem é uma administração a cada mês.

[0224]Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 10 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 20 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 30 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 40 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 60 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 80 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 100 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada semana a 160 mg/kg. Conforme usado no presente documento, a cada semana é entendido como o significado aceito na técnica de toda semana.

[0225]Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 10 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de

oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 20 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 30 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 40 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 60 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 80 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 100 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados quinzenalmente a 160 mg/kg. Conforme usado no presente documento, quinzenalmente é entendido como o significado aceito na técnica de a cada duas semanas.

[0226]Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 10 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 20 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 30 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 40 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 60 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 80 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 100 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a cada três semanas a 160 mg/kg. Conforme usado no presente documento, a cada três semanas é entendido como o significado aceito na técnica de uma vez em três semanas.

[0227]Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados mensalmente a 10 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de

oligômero antissenso são administrados mensalmente a 20 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados mensalmente a 30 mg/kg. Em várias modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados mensalmente a 40 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados mensalmente a 60 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados mensalmente a 80 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados mensalmente a 100 mg/kg. Em algumas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados mensalmente a 160 mg/kg. Conforme usado no presente documento, mensalmente é entendido como o significado aceito na técnica de todo mês.

[0228]Conforme seria entendido na técnica, administrações semanalmente, quinzenalmente, a cada três semanas, ou mensalmente podem estar em uma ou mais administrações ou sub-doses, conforme abordado no presente documento.

[0229]Moléculas de ácido nucleico e conjugados de oligômero antissenso descritos no presente documento podem ser administrados em células através de uma variedade de métodos conhecidos por aqueles familiares à técnica, que incluem, porém, sem limitação a encapsulação em lipossomas, por iontoporese, ou por incorporação em outros veículos, tal como hidrogéis, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradáveis e microesferas bioadesivas, conforme descrito no presente documento e conhecido na técnica. Em determinadas modalidades, a tecnologia de microemulsificação pode ser utilizada para melhorar a biocapacidade de agentes farmacêuticos lipofílicos (insolúveis em água). Exemplos incluem Trimetrina (Dordunoo, S. K., *et al.*, Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1.685 a 1.713, 1991) e REV 5901 (Sheen, P. C., *et al.*, J Pharm Sci 80(7), 712 a 714, 1991). Dentre outros benefícios, a microemulsificação fornece biocapacidade aprimorada preferencialmente direcionando-se a absorção no sistema linfático em vez do sistema circulatório, que, desse modo, desvia

do fígado, e evita a destruição dos compostos na circulação hepatobiliar.

[0230]Em um aspecto da divulgação, as formulações contêm micelas formadas a partir de um oligômero, conforme fornecido no presente documento, e pelo menos um carreador anfifílico, no qual as micelas têm um diâmetro médio menor que cerca de 100 nm. Modalidades mais preferenciais fornecem micelas que têm um diâmetro médio menor que cerca de 50 nm, e modalidades ainda mais preferenciais fornecem micelas que têm um diâmetro médio menor que cerca de 30 nm, ou ainda menor que cerca de 20 nm.

[0231]Embora todos os carreadores anfifílicos adequados sejam contemplados, os carreadores atualmente preferenciais são geralmente aqueles que têm a situação Geralmente Reconhecida como Segura (GRAS), e que podem tanto solubilizar um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação quanto microemulsificar o mesmo em um último estágio quando a solução entra em contato com uma fase de água complexa (tal como uma encontrada no trato gastrointestinal humano). Normalmente, ingredientes anfifílicos que satisfazem essas exigências têm valores de HLB (equilíbrio hidrofílico para lipofílico) de 2 a 20, e suas estruturas contêm radicais alifáticos de cadeia linear na faixa de C-6 a C-20. Exemplos são glicerídeos graxos de polietileno glicolizado e polietilenoglicós.

[0232]Exemplos de carreadores anfifílicos incluem glicerídeos de ácido graxo polietilenoglicolizados saturados e monoinsaturados, tais como aqueles obtidos a partir de vários óleos vegetais completa ou parcialmente hidrogenados. Tais óleos podem consistir vantajosamente em glicerídeos de ácido tri, di e mono graxo, e ésteres de di e monopoli(etilenoglicol) dos ácidos graxos correspondentes, com uma composição de ácido graxo particularmente preferencial que inclui 4 a 10% de ácido cáprico, 3 a 9% de ácido cáprico, 40 a 50% de ácido láurico, 14 a 24% de ácido mirístico, 4 a 14% de ácido palmítico e 5 a 15% de ácido esteárico. Outra classe útil de carreadores anfifílicos inclui sorbitana e/ou sorbitol parcialmente esterificado, com ácidos graxos

saturados ou monoinsaturados (série SPAN) ou análogos etoxilados correspondentes (série TWEEN).

[0233]Carreadores anfifílicos comercialmente anfifílicos podem ser particularmente úteis, que incluem a série Gelucire, Labrafil, Labrasol ou Lauroglicol (todos fabricados e distribuídos pela Gattefosse Corporation, Saint Priest, França), mono-oleato de PEG, di-oleato de PEG, monolaurato e dilaurato de PEG, Lecitina, Polissorbato 80, etc. (produzidos e distribuídos por diversas empresas nos E.U.A. e em todo o mundo).

[0234]Em determinadas modalidades, a entrega pode ocorrer através do uso de lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lipídio, vesículas e semelhantes, para a introdução das composições farmacêuticas da presente divulgação em células hospedeiras adequadas. Em particular, as composições farmacêuticas da presente divulgação podem ser formuladas para entrega sejam encapsuladas em uma partícula de lipídio, um lipossoma, uma vesícula, uma nanoesfera, uma nanopartícula ou semelhantes. A formulação e o uso de tais veículos de entrega podem ser realizados com o uso de técnicas conhecidas e convencionais.

[0235]Polímeros hidrofílicos adequados para uso na presente divulgação são aqueles que são prontamente solúveis em água, podem ser covalentemente ligados a um lipídio de formação de vesícula, e que são tolerados *in vivo* sem efeitos tóxicos (isto é, são biocompatíveis). Polímeros adequados incluem poli(etilenoglicol) (PEG), ácido polilático (também denominado polilactídeo), poliglicólico (também denominado poliglicólido), um copolímero de ácido polilático-poliglicólico, e álcool polivinílico. Em determinadas modalidades, polímeros têm um peso molecular ponderal médio de cerca de 100 ou 120 daltons até cerca de 5.000 ou 10.000 daltons, ou de cerca de 300 daltons a cerca de 5.000 daltons. Em outras modalidades, o polímero é poli(etilenoglicol) que tem um peso molecular ponderal médio de cerca de 100 a cerca de 5.000 daltons, ou que tem um peso molecular ponderal médio de cerca de 300 a cerca de

5.000 daltons. Em determinadas modalidades, o polímero é um poli(etilenoglicol) que tem um peso molecular ponderal médio de cerca de 750 daltons, por exemplo PEG(750). Polímeros também podem ser definidos pelo número de monômeros nos mesmos; uma modalidade preferencial da presente divulgação utiliza polímeros de pelo menos cerca de três monômeros, em que tais polímeros de PEG consistem em três monômeros que têm um peso molecular de aproximadamente 132 daltons.

[0236]Outros polímeros hidrofílicos que podem ser adequados para uso na presente divulgação incluem polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, metacrilamida de poli-hidroxipropila, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, e celuloses derivadas, tais como hidroximetilcelulose ou hidroxietilcelulose.

[0237]Em determinadas modalidades, uma formulação da presente divulgação compreende um polímero biocompatível selecionado a partir do grupo que consiste em poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos, polímeros de polivinila, poliglicólidos, polissiloxanos, poliuretanos e copolímeros dos mesmos, celuloses, polipropileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido lático e ácido glicólico, polianidridos, poli(orto)ésteres, poli(ácido bético), poli(ácido valérico), poli(lactídeo-co-caprolactona), polissacarídeos, proteínas, ácidos poli-hialurônicos, policianoacrilatos e mesclas, misturas, ou copolímeros dos mesmos.

[0238]Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, que consistem em 6, 7, ou 8 unidades de glicose, designadas pela letra grega  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ , respectivamente. As unidades de glicose são ligadas por ligações  $\alpha$ -1,4-glicosídicas. Como consequência da conformação em cadeira das unidades de açúcar, todos os grupos hidroxila secundários (em C-2, C-3) estão localizados em um lado do anel, enquanto todos os grupos hidroxila primários em C-6 estão situados no outro lado. Como resultado, as faces externas são hidrofílicas, tornando as ciclodextrinas solúveis em água. Em contraste, as cavidades das ciclodextrinas são hidrofóbicas, visto que são alinhadas pelo hidro-

gênio de átomos C-3 e C-5, e por oxigênios semelhantes a éter. Essas matrizes permitem a complexação com uma variedade de compostos relativamente hidrofóbicos, incluindo, por exemplo, compostos esteroides, como 17 $\alpha$ -estradiol (consultar, por exemplo, van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). A complexação ocorre por interações Van der Waals e por formação de ligação de hidrogênio. Para uma revisão geral da química de ciclodextrinas, consultar, Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803 a 822 (1994).

[0239]As propriedades físico-químicas dos derivados de ciclodextrina dependem fortemente do tipo e do grau de substituição. Por exemplo, sua solubilidade em água está na faixa de insolúvel (por exemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) a 147% solúvel (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Além disso, os mesmos são solúveis em muitos solventes orgânicos. As propriedades das ciclodextrinas possibilitam o controle sobre a solubilidade de vários componentes de formulação aumentando ou diminuindo-se sua solubilidade.

[0240]Várias ciclodextrinas e métodos para sua preparação foram descritos. Por exemplo, Parmeter (I), et al. (Patente nº U.S. 3.453.259) e Gramera, et al. (Patente nº U.S. 3.459.731) descreveram ciclodextrinas eletroneurais. Outros derivados incluem ciclodextrinas com propriedades catiônicas [Parmeter (II), Patente nº U.S. 3.453.257], ciclodextrinas reticuladas insolúveis (Solms, Patente nº U.S. 3.420.788), e ciclodextrinas com propriedades aniônicas [Parmeter (III), Patente nº U.S. 3.426.011]. Entre os derivados de ciclodextrina com propriedades aniônicas, ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfônicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfônicos, ácidos tiossulfínicos e ácidos sulfônicos foram anexos à ciclodextrina parental [consultar, Parmeter (III), supra]. Adicionalmente, os derivados de ciclodextrina de éter sulfoalquílico foram descritos por Stella, et al. (Patente nº U.S. 5.134.127).

[0241]Os lipossomos consistem em pelo menos uma membrana bicamada lipídica que envolve um compartimento interno aquoso. Os lipossomos podem ser caracterizados por tipo de membrana e por tamanho. Vesículas unilamelares pequenas (SUVs) têm uma membrana única e estão tipicamente na faixa entre 0,02 e 0,05 µm em diâmetro; vesículas unilamelares grandes (LUVS) são tipicamente maiores do que 0,05 µm. As vesículas grandes oligolamelares e vesículas multilamelares têm múltiplas camadas de membrana usualmente concêntricas e são tipicamente maiores do que 0,1 µm. Os lipossomos com diversas membranas não concêntricas, isto é, diversas vesículas menores contidas em uma vesícula maior, são denominados vesículas multivesiculares.

[0242]Um aspecto da presente divulgação se refere a formulações que compreendem lipossomos que contêm um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação, em que a membrana de lipossomo é formulada para fornecer um lipossomo com capacidade carreadora aumentada. Alternativa ou adicionalmente, o conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação pode ser contido, ou adsorvido, na bicamada de lipossomo do lipossomo. Um conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação pode ser agregado com um tensoativo lipídico e carreado no espaço interno do lipossomo; Nestes casos, a membrana de lipossomo é formulada para resistir aos efeitos de rompimento do agregado de agente ativo-tensoativo.

[0243]De acordo com uma modalidade da presente divulgação, a bicamada lipídica de um lipossomo contém lipídios derivados com poli(etíleno glicol) (PEG), de modo que as cadeias de PEG se estendam a partir da superfície interna da bicamada lipídica no espaço interior encapsulado pelo lipossomo, e se estendam a partir do exterior da bicamada lipídica no ambiente circundante.

[0244]Os agentes ativos contidos em lipossomos da presente divulgação es-

tão em forma solubilizada. Os agregados de tensoativo e agente ativo (como emulsões ou micelas que contêm o agente ativo de interesse) podem ser retidos no espaço interior de lipossomos de acordo com a presente divulgação. Um tensoativo atua para dispersar e solubilizar o agente ativo, e pode ser selecionado a partir de qualquer tensoativo alifático, cicloalifático ou aromático, incluindo, mas sem limitação, lisfostidilcolinas biocompatíveis (LPGs) de comprimentos de cadeia variáveis (por exemplo, de cerca de C14 a cerca de C20). Os lipídios derivados de polímero, como PEG-lipídios, também podem ser utilizados para formação de micela, visto que atuarão para inibir a fusão de micela/membrana, e visto que a adição de um polímero a moléculas tensoativas diminui o CMC do tensoativo e auxilia na formação de micela. São preferenciais os tensoativos com CMOs na faixa micromolar; os tensoativos CMC superiores podem ser utilizados para preparar micelas retidas em lipossomos da presente divulgação.

[0245]Os lipossomos de acordo com a presente divulgação podem ser preparados por qualquer uma entre uma variedade de técnicas que são conhecidas na arte. Consultar, por exemplo, a Patente nº U.S. 4.235.871; Pedido PCT publicado nº WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104; e Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdã, 1993. Por exemplo, os lipossomos da presente divulgação podem ser preparados difundindo-se um lipídio derivado com um polímero hidrofílico em lipossomos pré-formados, como expondo-se lipossomos pré-formados a micelas compostas de polímeros enxertados com lipídio, em concentrações de lipídio correspondentes à porcentagem de mols finais de lipídio derivado, que é desejável no lipossomo. Os lipossomos que contêm um polímero hidrofílico também podem ser formados por homogeneização, hidratação em campo de lipídio, ou técnicas de extrusão, conforme conhecido na técnica.

[0246]Em outro procedimento de formulação exemplificativo, o agente ativo é

primeiro dispersado por sonicação em uma lisfosfatidilcolina ou outro tensoativo de CMC baixo (incluindo lipídios enxertados com polímero) que solubiliza prontamente as moléculas hidrofóbicas. A suspensão micelar resultante de agente ativo é, então, usada para re-hidratar uma amostra de lipídio secada que contém uma porcentagem de mols adequada de lipídio enxertado com polímero, ou colesterol. O lipídio e a suspensão de agente ativo é, então, formada em lipossomos com o uso de técnicas de extrusão, conforme conhecido na técnica, e os lipossomos resultantes separados da solução encapsulada por separação de coluna padrão.

[0247]Em um aspecto da presente divulgação, os lipossomos são preparados para ter tamanhos substancialmente homogêneos em uma faixa de tamanho selecionada. Um método de dimensionamento eficaz envolve a extrusão de uma suspensão aquosa dos lipossomos através de uma série de membranas de policarbonato que têm um tamanho de poro uniforme selecionado; o tamanho de poro da membrana corresponderá estritamente aos maiores tamanhos de lipossomos produzidos por extrusão através daquela membrana. Consultar, por exemplo, a Patente nº U.S. 4.737.323 (12 de abril de 1988). Em certas modalidades, os reagentes, como DharmaFECT® e Lipofectamine®, podem ser utilizados para introduzir polinucleotídeos ou proteínas em células.

[0248]As características de liberação de uma formulação da presente divulgação dependem do material de encapsulação, a concentração de fármaco encapsulado, e da presença de modificadores de liberação. Por exemplo, a liberação pode ser manipulada para ser dependente de pH, por exemplo, com o uso de um revestimento sensível a pH que se libera apenas a um baixo pH, como no estômago, ou um pH mais alto, como no intestino. Um revestimento entérico pode ser usado para impedir a liberação de ocorrer até a passagem através do estômago. Múltiplos revestimentos ou misturas de cianamida encapsulados em materiais diferentes podem ser usados

para obter uma liberação inicial no estômago, seguido por liberação posterior no intestino. A liberação também pode ser manipulada por inclusão de sais ou agentes de formação de poro, os quais aumentam a ingestão de água ou liberação de fármaco por difusão da cápsula. Os excipientes que modificam a solubilidade do fármaco também podem ser usados para controlar a taxa de liberação. Os agentes que intensificam a degradação da matriz ou liberação da matriz também podem ser incorporados. Os mesmos podem ser adicionados ao fármaco, adicionados como uma fase separada (isto é, como particulados), ou podem ser codissolvidos na fase de polímero dependendo do composto. Na maioria dos casos cases em que a quantidade deve estar entre 0,1 e 30 por cento (p/p de polímero). Tipos de intensificadores de degradação incluem sais inorgânicos, como sulfato de amônio e cloreto de amônio, ácidos orgânicos, como ácido cítrico, ácido benzoico e ácido ascórbico, bases inorgânicas, como carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de cálcio, carbonato de zinco e hidróxido de zinco, e bases orgânicas, como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina e trietanolamina e tensoativos, como Tween® e Pluronic®. Os agentes de formação de poro que adicionam microestrutura às matrizes (isto é, compostos solúveis em água, como sais e açúcares inorgânicos) são adicionados como particulados. A faixa está tipicamente entre um e trinta por cento (p/p de polímero).

[0249]A ingestão também pode ser manipulada alterando-se o tempo de residiência das partículas no intestino. Isso pode ser alcançado, por exemplo, revestindo-se a partícula com, ou selecionando-se como o material de encapsulação, um polímero adesivo mucosal. Os exemplos incluem a maioria dos polímeros com grupos carboxila livres, como quitosana, celuloses e especialmente poliacrilatos (conforme usado no presente documento, poliacrilatos se referem a polímeros incluindo grupos acrilato e grupos acrilato modificados, como cianoacrilatos e metacrilatos).

[0250]Um conjugado de oligômero antissenso pode ser formulado para ser

contido em, ou, adaptado para liberar por um dispositivo ou implante cirúrgico ou médico. Em certos aspectos, um implante pode ser revestido ou tratado de outro modo com um conjugado de oligômero antissenso. Por exemplo, hidrogéis, ou outros polímeros, como polímeros biocompatíveis e/ou biodegradáveis, podem ser usados para revestir um implante com as composições farmacêuticas da presente divulgação (isto é, a composição pode ser adaptada para uso com um dispositivo médico usando-se um hidrogel ou outro polímero). Os polímeros e copolímeros para revestir dispositivos médicos com um agente são bem conhecidos na técnica. Os exemplos de implantes incluem, mas sem limitação, estentes, estentes de eluição de fármaco, suturas, próteses, cateteres vasculares, cateteres de diálise, enxertos vasculares, válvulas cardíacas prostéticas, marca-passo cardíaco, desfibriladores cardioversores desfibriladores implantáveis, agulhas IV, dispositivos para definição e formação óssea, como pinos, parafusos, placas e outros dispositivos, e matrizes de tecido artificial para cura de lesão.

[0251]Além dos métodos fornecidos no presente documento, os conjugados de oligômero antissenso para uso de acordo com a divulgação podem ser formulados para administração em qualquer maneira conveniente para uso em medicina humana ou veterinária, por analogia com outros produtos farmacêuticos. Os conjugados de oligômero antissenso e suas formulações correspondentes podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outras estratégias terapêuticas no tratamento de distrofia muscular, como transplante de mioblasto, terapias de célula-tronco, administração de antibióticos de aminoglicosídeo, inibidores de proteassoma, e terapias de regulação crescente (por exemplo, regulação crescente de utrofina, um parólogo autossômico de distrofina).

[0252]Em algumas modalidades, o produto terapêutico adicional pode ser administrado antes, concomitantemente ou subsequentemente à administração do conjugado de oligômero antissenso da presente divulgação. Por exemplo, os conjugados

de oligômero antissenso podem ser administrados em combinação com um esteroide e/ou antibiótico. Em certas modalidades, os conjugados de oligômero antissenso são administrados a um paciente que está em terapia de esteroide de fundo (por exemplo, terapia de esteroide de fundo intermitente ou crônica/contínua). Por exemplo, em algumas modalidades, o paciente foi tratado com um corticosteroide antes da administração de um oligômero antissenso e continua a receber a terapia de esteroide. Em algumas modalidades, o esteroide é glicocorticoide ou prednisona.

[0253]As rotas de administração descritas são destinadas apenas como um guia visto que um praticante versado na técnica poderá determinar prontamente a rota otimizada de administração e qualquer dosagem para qualquer animal e afecção particular. Múltiplas abordagens para introduzir material genético novo funcional em células, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, foram tentadas (Friedmann (1989) *Science*, 244:1.275 a 1.280). Essas abordagens incluem a integração do gene para ser expressado em retrovírus modificados (Friedmann (1989) *supra*; Rosenberg (1991) *Cancer Research* 51(18), suppl.: 5074S a 5079S); integração em vetores não retrovírus (por exemplo, vetores virais adenoassociados) (Rosenfeld, et al. (1992) *Cell*, 68:143 a 155; Rosenfeld, et al. (1991) *Science*, 252:431 a 434); ou administração de um transgene ligado a um elemento promotor-intensificador heterólogo por meio de lipossomos (Friedmann (1989), *supra*; Brigham, et al. (1989) *Am. J. Med. Sci.*, 298:278 a 281; Nabel, et al. (1990) *Science*, 249:1.285 a 1.288; Hazinski, et al. (1991) *Am. J. Resp. Cell Molec. Biol.*, 4:206 a 209; e Wang e Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 84:7.851 a 7.855); acoplado a sistemas de transporte com base em cátion específicos de ligando (Wu e Wu (1988) *J. Biol. Chem.*, 263:14.621 a 14.624) ou o uso de DNA nu, vetores de expressão (Nabel et al. (1990), *supra*; Wolff et al. (1990) *Science*, 247:1.465 a 1.468). A injeção direta de transgenes no tecido produz apenas expressão localizada (Rosenfeld (1992) *supra*; Rosenfeld et al. (1991) *supra*; Brigham et al. (1989) *supra*; Nabel (1990) *supra*; e Hazinski et al. (1991) *supra*). O grupo Brigham et

al. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278 a 281 e Clinical Research (1991) 39 (resumo)) relataram transfecção *in vivo* apenas de pulmões de camundongos que seguem a administração intravenosa ou intratraqueal de um complexo de lipossomo de DNA. Um exemplo de um artigo de revisão de procedimentos de terapia de gene humano é: Anderson, Science (1992) 256:808 a 813.

[0254]Em uma modalidade adicional, composições farmacêuticas da divulgação podem compreender adicionalmente um carboidrato conforme fornecido em Han *et al.*, Nat. Comms. 7, 10.981 (2016), cuja totalidade está incorporada ao presente documento, a título de referência. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da divulgação podem compreender 5% de um hexose carboidrato. Por exemplo, a composição farmacêutica da divulgação pode compreender 5% de glicose, 5% de frutose ou 5% de manose. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas da divulgação podem compreender 2,5% de glicose e 2,5% de frutose. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da divulgação podem compreender um carboidrato selecionado a partir de: arabinose presente em uma quantidade de 5% em volume, glicose presente em uma quantidade de 5% em volume, sorbitol presente em uma quantidade de 5% em volume, galactose presente em uma quantidade de 5% em volume, frutose presente em uma quantidade de 5% em volume, xilitol presente em uma quantidade de 5% em volume, manose presente em uma quantidade de 5% em volume, uma combinação de glicose e frutose cada uma presente em uma quantidade de 2,5% em volume, e uma combinação de glicose presente em uma quantidade de 5,7% em volume, frutose presente em uma quantidade de 2,86% em volume, e xilitol presente em uma quantidade de 1,4% em volume.

#### IV. Métodos de uso

##### Restauração do quadro de leitura de distrofina com o uso de salto de exón

[0255]Uma potencial abordagem terapêutica para o tratamento da DMD causada por mutações fora do quadro no gene da distrofina é sugerida pela forma mais

leve da distrofinopatia conhecida como BMD, que é causada por mutações em quadro. A capacidade de converter uma mutação fora do quadro em uma mutação em quadro preservaria hipoteticamente o quadro de leitura do mRNA e produziria uma proteína distrofina internamente encurtada, mas funcional. Os conjugados de oligômero antisenso da divulgação foram concebidos para atingir isso.

[0256]A hibridização do PMO com a sequência pré-mRNA direcionada interfere na formação do complexo de splicing pré-mRNA e deleta o éxon 53 do mRNA maduro. A estrutura e conformação de conjugados de oligômero antissenso da divulgação permitem o pareamento de bases específico da sequência com a sequência complementar. Por mecanismo similar, eteplirsen, por exemplo, que é um PMO que foi concebido para pular o éxon 51 do pré-mRNA da distrofina, permite o pareamento de bases específico da sequência com a sequência complementar contida no éxon 51 do pré-mRNA da distrofina.

[0257]O mRNA de distrofina normal contendo todos os 79 éxons produzirá uma proteína distrofina normal. O gráfico na Figura 1 representa uma pequena seção do pré-mRNA da distrofina e do mRNA maduro, do éxon 47 para o éxon 53. O formato de cada éxon mostra como os códons são divididos entre os éxons; de nota, um códon consiste em três nucleotídeos. Os éxons retangulares começam e terminam com códons completos. Os éxons com formato de seta começam com um códon completo, mas terminam com um códon dividido, contendo apenas o nucleotídeo nº 1 do códon. Os nucleotídeos nº 2 e nº 3 desse códon estão contidos no éxon subsequente que começará com um formato em vértice.

[0258]Os mRNA da distrofina que não possuem éxons inteiros do gene da distrofina resultam tipicamente na DMD. O gráfico da Figura 2 ilustra um tipo de mutação genética (deleção do éxon 50) que é conhecida por resultar em DMD. Como o éxon 49 termina em um códon completo e o éxon 51 começa com o segundo nucleotídeo de um códon, o quadro de leitura após o éxon 49 é deslocado, resultando em

quadro de leitura de mRNA fora do quadro e na incorporação de aminoácidos incorretos a jusante da mutação. A subsequente ausência de um domínio funcional de ligação do distroglicano C-terminal resulta na produção de uma proteína distrofina instável.

[0259]Eteplirsen pula o éxon 51 para restabelecer o quadro de leitura de mRNA. Como o éxon 49 termina em um códon completo e o éxon 52 começa com o primeiro nucleotídeo de um códon, a deleção do éxon 51 restabelece o quadro de leitura, resultando na produção de uma proteína distrofina internamente encurtada com um sítio de ligação de distroglicano intacto, similar a uma mutação da DMD “em quadro” (Figura 3).

[0260]A viabilidade de melhorar o fenótipo de DMD com o uso de salto do éxon para restabelecer o quadro de leitura aberto de mRNA da distrofina é suportada por pesquisa não clínica. Inúmeros estudos em modelos de animal distrófico de DMD mostraram que a restabelecimento da distrofina pelo salto de éxon leva a aprimoramentos confiáveis na força e função muscular (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). Um exemplo convincente disso vem de um estudo em que os níveis de distrofina após o salto do éxon (com o uso de uma terapia de PMO) foram comparados com a função muscular no mesmo tecido. Em camundongos mdx distróficos, os músculos tibial anterior (TA) tratados com PMO específico de camundongos mantiveram ~75% de sua capacidade máxima de força após contrações indutoras de estresse, enquanto os músculos TA contralaterais não tratados mantiveram apenas ~25% de sua capacidade máxima de força ( $p <0,05$ ) (Sharp 2011). Em um outro estudo, 3 cães CXMD distróficos receberam, com 2 a 5 meses de vida, terapia de salto de éxon com o uso de PMO específico para sua mutação genética uma vez por semana por 5 a 7 semanas ou a cada duas semanas por 22 semanas. Após a terapia do salto do éxon, todos os 3 cães demonstraram uma

expressão extensa da distrofina no músculo esquelético em todo o corpo, bem como uma manutenção ou aprimoramento da ambulação (teste de corrida de 15 m) em relação à linha de base. Em contrapartida, cães CXMD de tempo de vida compatível não tratados mostraram uma diminuição marcada na ambulação ao longo do curso do estudo (Yokota 2009).

[0261]Demonstrou-se que os PMOs têm mais atividade de salto de éxon em concentrações equimolares do que fosforotioatos tanto em camundongos mdx quanto no modelo de camundongo DMD humanizado (hDMD), que expressa todo o transcrito DMD humano (Heemskirk 2009). Experimentos *in vitro* com o uso de reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa (RT-PCR) e Western blot (WB) em células normais do músculo esquelético humano ou células musculares de pacientes com DMD com diferentes mutações passíveis de salto de éxon 51 identificaram eteplirsen (um PMO) como um potente indutor do salto de éxon 51. O salto do éxon 51 induzido por Eteplirsen foi confirmado *in vivo* no modelo de camundongo hDMD (Arechavala-Gomeza 2007).

[0262]Os resultados clínicos para analisar o efeito de um conjugado de oligômero antissenso que é complementar a uma região alvo do éxon 53 do pré-mRNA da distrofina humana e induz o salto do éxon 53 incluem fibras positivas para distrofina percentual (PDPF), teste de caminhada de seis minutos (6MWT), perda de ambulação (LOA), Avaliação Ambulatorial North Star (NSAA), testes de função pulmonar (TFP), capacidade de ficar de pé (de uma posição supina) sem suporte externo, produção de novo de distrofina e outras medidas funcionais.

[0263]Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece métodos para produzir distrofina em um indivíduo que tem uma mutação do gene da distrofina que é passível de salto do éxon 53, em que o método compreende administrar ao indivíduo um conjugado de oligômero antissenso, ou sal farmaceuticamente aceitável do

mesmo, conforme descrito no presente documento. Em certas modalidades, a presente divulgação fornece métodos para restabelecer um quadro de leitura de mRNA para induzir a produção de proteína distrofina em um indivíduo com distrofia muscular de Duchenne (DMD) que tem uma mutação do gene da distrofina que é passível de salto do éxon 53. A produção de proteína pode ser medida por reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), análise de Western blot ou imuno-histoquímica (IHC).

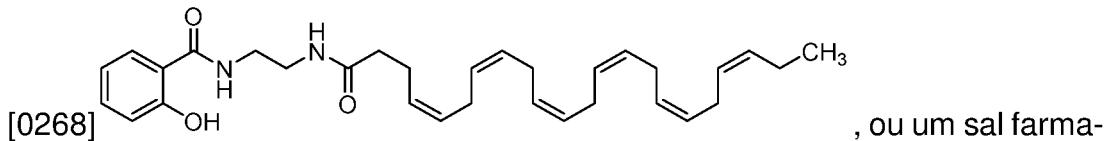
[0264]Em algumas modalidades, a presente divulgação fornece métodos para tratar DMD em um indivíduo em necessidade do mesmo, em que o indivíduo tem uma mutação do gene da distrofina que é passível de salto do éxon 53, em que o método compreende administrar ao indivíduo um conjugado de oligômero antissenso, ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme descrito no presente documento. Em várias modalidades, o tratamento do indivíduo é medido pelo atraso da progressão da doença. Em algumas modalidades, o tratamento do indivíduo é medido pela manutenção da ambulação no indivíduo ou pela redução de perda da ambulação no indivíduo. Em algumas modalidades, a ambulação é medida com o uso do Teste de Caminhada de 6 Minutos (6MWT). Em certas modalidades, a ambulação é medida com o uso da Avaliação Ambulatorial North Start (NSAA).

[0265]Em várias modalidades, a presente divulgação fornece métodos para manter a função pulmonar ou reduzir a perda da função pulmonar em um indivíduo com DMD, em que o indivíduo tem uma mutação do gene de DMD que é passível de salto do éxon 53, em que o método compreende administrar ao indivíduo um conjugado de oligômero antissenso, ou sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme descrito no presente documento. Em algumas modalidades, a função pulmonar é medida como Pressão Máxima Expiratória (MEP). Em certas modalidades, a função pulmonar é medida como Pressão Máxima Inspiratória (MIP). Em algumas modalidades, a função pulmonar é medida como Capacidade Vital Forçada (FVC).

[0266]Em uma modalidade adicional, as composições farmacêuticas da divulgação podem ser coadministradas com um carboidrato nos métodos da revelação, na mesma formulação ou é uma formulação separada, conforme fornecido em Han *et al.*, Nat. Comms. 7, 10.981 (2016), cuja totalidade está incorporada ao presente documento, a título de referência. Em algumas modalidades, as composições farmacêuticas da divulgação podem ser coadministradas com 5% de um hexose carboidrato. Por exemplo, as composições farmacêuticas da divulgação podem ser coadministradas com 5% de glicose, 5% de frutose ou 5% de manose. Em certas modalidades, as composições farmacêuticas da divulgação podem ser coadministradas com 2,5% de glicose e 2,5% de frutose. Em algumas modalidades, a composição farmacêutica da divulgação pode ser coadministrada com um carboidrato selecionado a partir de: arabinose presente em uma quantidade de 5% em volume, glicose presente em uma quantidade de 5% em volume, sorbitol presente em uma quantidade de 5% em volume, galactose presente em uma quantidade de 5% em volume, frutose presente em uma quantidade de 5% em volume, xilitol presente em uma quantidade de 5% em volume, manose presente em uma quantidade de 5% em volume, uma combinação de glicose e frutose cada uma presente em uma quantidade de 2,5% em volume, e uma combinação de glicose presente em uma quantidade de 5,7% em volume, frutose presente em uma quantidade de 2,86% em volume, e xilitol presente em uma quantidade de 1,4% em volume.

[0267]Em diversas modalidades, um conjugado de oligômero antissenso da divulgação é coadministrado com uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto anti-inflamatório não esteroidal. Em algumas modalidades, o composto anti-inflamatório não esteroidal é um inibidor de NF-kB. Por exemplo, em algumas modalidades, o inibidor de NF-kB pode ser CAT-1004 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em diversas modalidades, o inibidor de NF-kB pode ser um conjugado de salicilato e DHA. Em algumas modalidades, o inibidor de NF-kB é CAT-1041 ou um

sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Em certas modalidades, o inibidor de NF-kB é um conjugado de salicilato e EPA. Em diversas modalidades, o inibidor de NF-kB é



ceuticamente aceitável do mesmo.

[0269] Em algumas modalidades, o composto anti-inflamatório não esteroidal é um inibidor de TGF-β. Por exemplo, em certas modalidades, o inibidor de TGF-β é HT-100.

[0270] Em certas modalidades, é descrito um conjugado de oligômero antissenso, conforme descrito no presente documento, para uso em terapia. Em certas modalidades, é descrito um conjugado de oligômero antissenso, conforme descrito no presente documento, para uso no tratamento de distrofia muscular de Duchenne. Em certas modalidades, é descrito um conjugado de oligômero antissenso conforme descrito no presente documento para uso na fabricação de um medicamento para uso em terapia. Em certas modalidades, é descrito um conjugado de oligômero antissenso conforme descrito no presente documento para uso na fabricação de um medicamento para o tratamento de distrofia muscular de Duchenne.

#### V. Kits

[0271] A divulgação também fornece kits para o tratamento de um paciente com uma doença genética, em que o kit compreende pelo menos uma molécula antissenso (por exemplo, um conjugado de oligômero antissenso apresentado na SEQ ID NO: 1), embalada em um recipiente adequado, junto com instruções para seu uso. Os kits também podem conter reagentes periféricos, tais como tampões, estabilizadores, etc. Os versados na técnica devem apreciar que as aplicações do método acima têm ampla aplicação para identificar moléculas antissenso adequadas para uso no

tratamento de muitas outras doenças. Em uma modalidade, o kit compreende um conjugado de oligômero antissenso de acordo com a Fórmula (III).

### Exemplos

[0272]Embora a divulgação anterior tenha sido descrita com algum detalhe por meio de ilustração e exemplo para fins de clareza de compreensão, ficará prontamente evidente para um versado na técnica à luz dos ensinamentos desta divulgação de que certas alterações e modificações podem ser realizadas sem afastar-se do espirito ou escopo das reivindicações anexas. Os exemplos a seguir são fornecidos a título de ilustração apenas e não como limitação. Os versados na técnica reconhecerão prontamente uma variedade de parâmetros não críticos que poderiam ser alterados ou modificados para produzir resultados essencialmente similares.

### Materiais e métodos

#### Condições de tratamento de cultura de tecido e célula

[0273]Miócitos humanos diferenciados (ZenBio, Inc.) foram usados para medir o salto de éxon. Especificamente, mioblastos (ZenBio, Inc., SKB-F) foram cultivados para confluência de 80 a 90% a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em meio de crescimento (SKB-M; ZenBio, Inc.). A diferenciação foi iniciada mediante a substituição do meio de crescimento pelo meio de diferenciação (SKM-D; ZenBio, Inc.). Para analisar o salto de éxon 53, 1 x 10<sup>4</sup> células diferenciadas foram colocadas em uma placa de 24 poços e 1 ml de meio de diferenciação (SKM-D; ZenBio, Inc.) que contém diversas concentrações de PMO ou PPMO foi adicionado a cada poço e incubado durante 96 horas.

#### Análise de Western blot

[0274]Para análise de western blot, o tecido foi homogeneizado com tampão de homogeneização (4% de SDS, ureia 4 M, tris-HCl 125 mM (pH 6,8)) em uma razão entre 9 e 18 x seções de tecido de 20 µm em aproximadamente 5 mm de diâmetro em 133 µl de tampão. O lisado correspondente foi coletado e submetido à quantificação

de proteína com o uso do kit de ensaio de proteína RC DC de acordo com as instruções do fabricante (BioRad Cat. 500-0122). As amostras de extrato de tecido foram diluídas 1:10 com o uso de tampão de homogeneização para ficar dentro da faixa da curva padrão de BSA. As amostras foram preparadas de modo que 35 µl de amostra iriam conter a quantidade desejada de proteína com o uso de 25 µl de lisado de proteína, 7 µl de tampão de amostra NuPAGE LDS (Life Technologies Cat. NP0008, Carlsbad, Califórnia, EUA) e 3 µl de agente redutor NuPAGE (10 x) (Life Technologies Cat. NP0004). Após o aquecimento das amostras de proteína durante 5 minutos a 95 °C, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi carregado em um mini gel de tris-acetato de poliacrilamida a 3 a 8%, 10 poços, 1 mm, NuPAGE Novex (Life Technologies Cat. EA0375) em um máximo de 50 µg de carga de proteína total por faixa. O gel foi executado em 150 volts à temperatura ambiente até que a frente de corante tivesse escorrido do gel. Os géis de proteína resultantes foram transferidos para membranas de PVDF (Life Technologies Cat. LC2007) durante 75 minutos à temperatura ambiente com 30 volts com o uso de tampão de transferência NuPAGE (Life Technologies NP006-1), 10% de metanol e 0,1% de antioxidante NuPAGE (Life Technologies NP0005).

[0275]Após a transferência de proteína, as membranas de PVDF foram imersas em tampão TTBS (1X TBS (Amresco Cat. J640-4L), 0,1% (em v/v) de tween-20). As membranas foram transferidas para o tampão bloqueador (5% (em p/v) leite em pó desnatado (Lab Scientific Cat. M0841) em TTBS) e embebidas de um dia para o outro a 4 °C com balanço delicado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente em DYS1 (Leica Cat. NCL-DYS1) diluído 1:20 com o uso de tampão bloqueador, ou 20 minutos à temperatura ambiente em anticorpo anti- $\alpha$ -actinina (Sigma-Aldrich Cat. NA931V) diluído 1:100.000 com tampão bloqueador, seguido de seis lavagens (cinco minutos cada com TTBS). Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase de raiz-forte (GE Healthcare Cat. NA931V)

foi diluído 1:40.000 com o uso de tampão bloqueador e adicionado às membranas durante 45 minutos (DYS1) ou 15 minutos ( $\alpha$ -actinina), seguido novamente por seis lavagens. Com o uso do kit de detecção ECL Prime Western (GE Healthcare Cat. RPN2232), o filme foi exposto ao gel e desenvolvido consequentemente. O filme desenvolvido foi submetido à varredura e analisado com o uso do software ImageQuant TL Plus (versão 8.1) e a análise de regressão linear foi realizada com o uso de software Graphpad.

[0276]Cada gel de Western blot inclui uma curva padrão de distrofina de 4 ou 5 pontos preparada com o uso de proteína total extraída do tecido normal (quadríceps, diafragma ou coração de camundongo) diluída a, por exemplo, 64%, 16%, 4%, 1% e 0,25% (consultar, por exemplo, Figuras 5A e 5B) e enriquecida em extrato de tecido DMD (por exemplo, quadríceps, diafragma ou coração de camundongo mdx, ou quadríceps, diafragma ou músculo liso NHP (GI)). As amostras de curva padrão foram processadas conforme descrito acima. Os níveis de proteína de distrofina como porcentagem de níveis de distrofina do tipo selvagem (% de WT) foram determinados mediante a comparação de intensidades de banda de distrofina com a curva padrão de gel.

#### Análise de RT-PCR

[0277]Para a análise de RT-PCR, o RNA foi isolado das células com o uso do kit Illustra GE spin seguindo o protocolo do fabricante. A concentração e pureza do RNA foi determinada com o uso de um NanoDrop. O salto de éxon 53 foi medido por RT-PCR com um iniciador direto que liga a junção de éxon 51/52 e 54 SEQ ID NO: 5 (5'-CATCAAGCAGAACCAA-3') e um iniciador inverso que liga a junção de éxon 51/52 e 54 SEQ ID NO: 6 (5'-GAAGTTCAAGGCCAAGTCA-3'). Um éxon 53 pulado resultou em um amplicon de 201 bp e um éxon 53 não pulado resultou em um amplicon de 413 bp.

[0278]O salto de éxon 23 de camundongo foi medido por RT-PCR com um

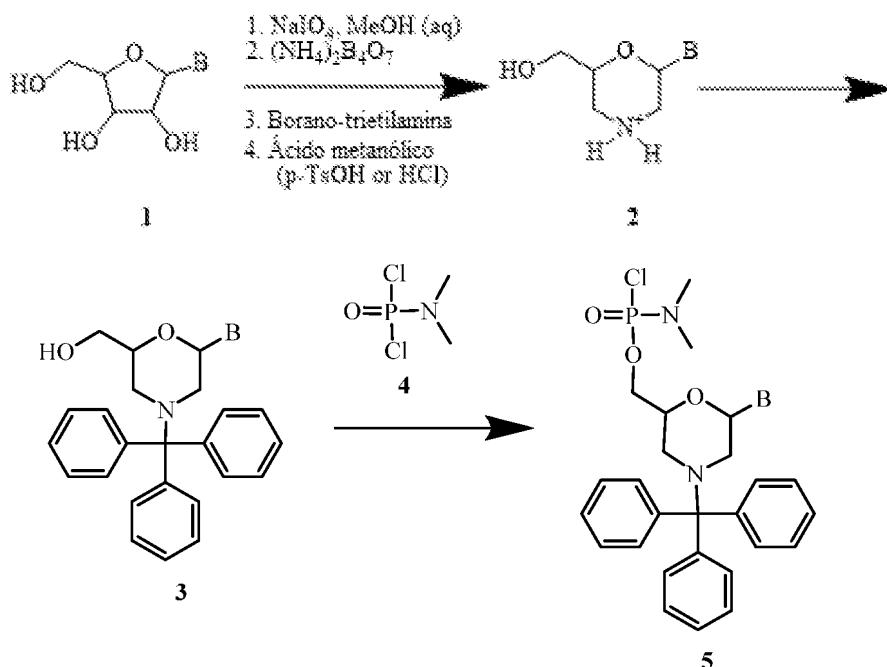
iniciador direto-SEQ ID NO: 7 (5'-CACATCTTGATGGTGTGAGG-3') e um iniciador inverso SEQ ID NO: 8 (5'- CAACTTCAGCCATCCATTCTG -3').

[0279]Depois que o RNA foi submetido a RT-PCR, as amostras foram analisadas com o uso de uma máquina Caliper, que usa eletroforese capilar de gel. A porcentagem de salto de éxon foi calculada com o uso da seguinte equação: (área sob a curva para bandas puladas)/(soma de área sob a curva para bandas puladas e não puladas)x100.

#### Imunoistoquímica: coloração de distrofina:

[0280]Seções de tecido congeladas de 10 mícrons do quadríceps de camundongo foram usadas para detectar a distrofina por anticorpo primário de distrofina (diluição 1:250, coelho, Abcam, nº de catálogo ab15277) em 10% de soro de cabra + 1% de BSA em PBS e anticorpo secundário de cabra anti-coelho Alexa-Fluoro 488 (diluição de 1:1.000) em 10% de soro de cabra + 1% de BSA.

#### Preparação de subunidades de morfolino



#### Esquema 1: via sintética geral para subunidades de pmo

[0281]Com referência ao Esquema 1, em que B representa uma parte de pareamento de bases, as subunidades de morfolino podem ser preparadas a partir do

ribonucleosídeo correspondente (1), como mostrado. A subunidade de morfolino (2) pode ser opcionalmente protegida por reação com um precursor de grupo protetor adequado, por exemplo, cloreto de tritila. O grupo protetor 3' é geralmente removido durante a síntese de oligômeros de estado sólido, conforme descrito em mais detalhes abaixo. A parte de pareamento de bases pode ser adequadamente protegida para a síntese de oligômeros de fase sólida. Grupos protetores adequados incluem benzoíla para adenina e citosina, fenilacetila para guanina e pivaloiloximetila para hipoxantina (I). O grupo pivaloiloximetila pode ser introduzido na posição N1 da base heterocíclica de hipoxantina. Embora uma subunidade de hipoxantina desprotegida possa ser empregada, os rendimentos em reações de ativação são muito superiores quando a base é protegida. Outros grupos de proteção adequados incluem aqueles divulgados na Patente nº US 8.076.476, que está aqui incorporada a título de referência em sua totalidade.

[0282]A reação de 3 com o composto de fósforo ativado 4 resulta em subunidades de morfolino com a parte de ligação desejada 5.

[0283]Os compostos de estrutura 4 podem ser preparados com o uso de qualquer número de métodos conhecidos pelos versados na técnica. O acoplamento com a parte de morfolino então avança conforme apresentado acima.

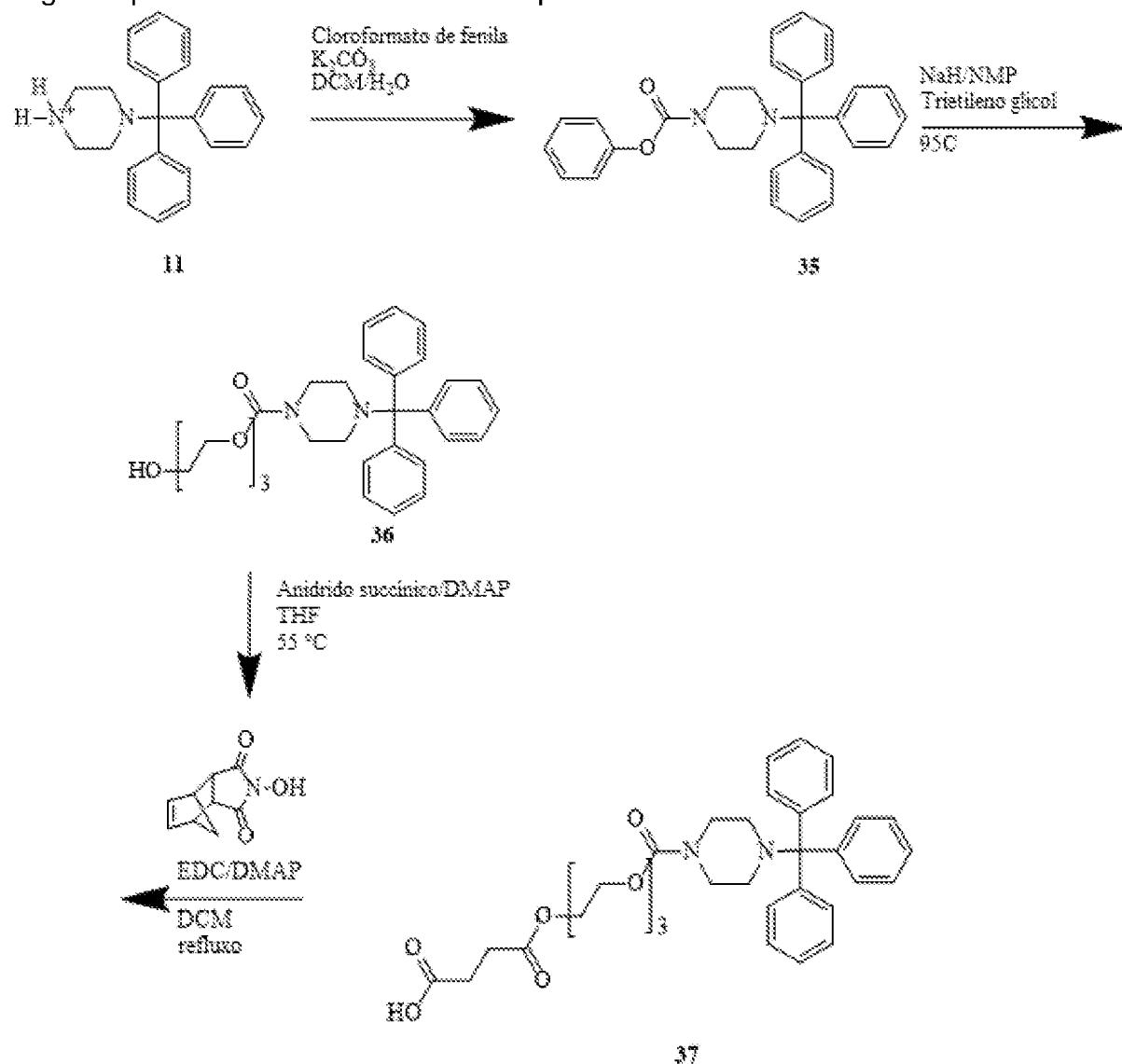
[0284]Os compostos de estrutura 5 podem ser usados na síntese de oligômeros de fase sólida para preparação de oligômeros que compreendem as ligações intersubunidades. Tais métodos são bem conhecidos na técnica. Resumidamente, um composto de estrutura 5 pode ser modificado na extremidade 5' para conter um ligante a um suporte sólido. Uma vez suportado, o grupo protetor de 5 (por exemplo, tritila na extremidade 3') é removido e a amina livre é reagida com uma parte de fósforo ativada de um segundo composto de estrutura 5. Essa sequência é repetida até que o oligo de comprimento desejado seja obtido. O grupo protetor na extremidade terminal 3' ou pode ser removido ou deixado se for desejada uma modificação de 3'. O oligo pode

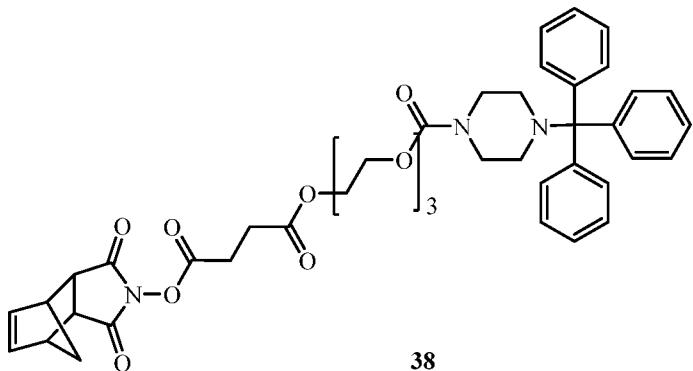
ser removido do suporte sólido com o uso de qualquer número de métodos, ou tratamento exemplificador com uma base para clivar a ligação ao suporte sólido.

[0285] A preparação de oligômeros morfolino em geral e oligômeros morfolino específicos da divulgação é descrita em mais detalhes nos Exemplos.

#### Preparação de oligômeros de morfolino

[0286] A preparação dos compostos da divulgação é realizada com o uso do seguinte protocolo de acordo com o Esquema 2:





Esquema 2: preparação de ácido de cauda ativada

[0287]Preparação de carbamato de tritil piperazina fenila 35: A uma suspensão resfriada do composto 11 em diclorometano (6 ml/g de 11) adicionou-se uma solução de carbonato de potássio (3,2 eq) em água (4 ml/g de carbonato de potássio). A esta mistura de duas fases foi lentamente adicionada uma solução de cloroformato de fenila (1,03 eq) em diclorometano (2 g/g de cloroformato de fenila). A mistura de reação foi aquecida a 20 °C. No final da reação (1 a 2 h), as camadas foram separadas. A camada orgânica foi lavada com água e seca em carbonato de potássio anidro. O produto 35 foi isolado por cristalização de acetonitrila.

[0288]Preparação de álcool de carbamato 36: Hidreto de sódio (1,2 eq) foi suspenso em 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidreto de sódio). A esta suspensão foram adicionados trietilenoglicol (10,0 eq) e o composto 35 (1,0 eq). A pasta aquosa resultante foi aquecida até 95 °C. No final da reação (1 a 2 h), a mistura foi resfriada para 20 °C. A essa mistura foi adicionado diclorometano/terc-butil éter metílico a 30% (em v:v) e água. A camada orgânica contendo produto foi lavada sucessivamente com NaOH aquoso, ácido succínico aquoso e cloreto de sódio aquoso saturado. O produto 36 foi isolado por cristalização de diclorometano/éter metil terc-butílico/heptano.

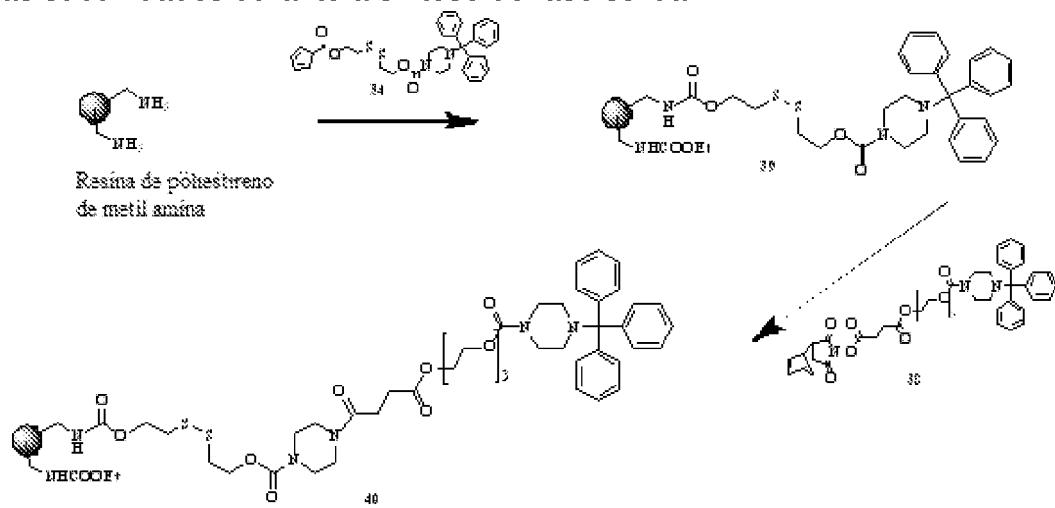
[0289]Preparação de ácido de cauda 37: A uma solução do composto 36 em tetraidrofurano (7 ml/g de 36) foi adicionado anidrido succínico (2,0 eq) e DMAP (0,5 eq). A mistura foi aquecida a 50 °C. No final da reação (5 h), a mistura foi resfriada para 20 °C e ajustada para pH 8,5 com NaHCO<sub>3</sub> aquoso. Adicionou-se éter metil-terc-

butílico e o produto foi extraído para a camada aquosa. Foi adicionado diclorometano e a mistura foi ajustada a pH 3 com ácido cítrico aquoso. A camada orgânica contendo produto foi lavada com uma mistura de tampão de citrato a pH = 3 e cloreto de sódio aquoso saturado. Esta solução de diclorometano de 37 foi usada sem isolamento na preparação do composto 38.

[0290]Preparação de 38: À solução do composto 37 foi adicionada imida de ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1,02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq) e, então, cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodíimida (EDC) (1,1 eq). A mistura foi aquecida a 55 °C. No final da reação (4 a 5 horas), a mistura foi resfriada a 20 °C e lavada sucessivamente com ácido cítrico 0,2 M/salmoura a 1:1 e salmoura. A solução de diclorometano sofreu troca de solvente para acetona e, então, para N, N-dimetilformamida, e o produto foi isolado por precipitação de acetona/N,N-dimetilformamida em cloreto de sódio aquoso saturado. O produto bruto foi ressuspenso várias vezes em água para remover N,N-dimetilformamida e sais residuais.

[0291]Método de síntese de PMO A: Uso de âncora de dissulfeto

[0292]A introdução da “Cauda” ativada na resina carregada com âncora foi realizada em dimetil imidazolidinona (DMI) pelo procedimento usado para a incorporação das subunidades durante a síntese de fase sólida.



Esquema 3: preparação do suporte sólido para a síntese de oligômeros morfolino

[0293] Esse procedimento foi realizado em um recipiente de peptídeo revestido silanizado (ChemGlass, NJ, EUA) com uma frita de vidro de porosidade grossa (40 a 60 µm), agitador suspenso e torneira de 3 vias Teflon para permitir que N<sub>2</sub> borbulhe através da frita ou uma extração a vácuo.

[0294] As etapas de tratamento/lavagem de resina no seguinte procedimento consistem em duas operações básicas: fluidização de resina ou reator de leito agitado e extração de solvente/solução. Para fluidização de resina, a torneira foi posicionada para permitir o fluxo de N<sub>2</sub> através da frita e o tratamento/lavagem de resina especificado foi adicionado ao reator e deixado permear e molhar completamente a resina. A mistura foi, então, iniciada e a pasta aquosa de resina misturada durante o tempo especificado. Para extração com solvente/solução, a mistura e o fluxo de N<sub>2</sub> foram interrompidos e a bomba de vácuo foi iniciada e, então, a torneira foi posicionada para permitir a evacuação do tratamento/lavagem de resina para o lixo. Todos os volumes de tratamento/lavagem de resina foram de 15 ml/g de resina, salvo indicação em contrário.

[0295] À resina de aminometilpoliestireno (mesh de 100 a 200; ~1,0 mmol/g de carga com base na substituição de nitrogênio; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, RU, parte nº 1464-X799) em um recipiente de peptídeo revestido silanizado foi adicionada 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) e foi permitido que a resina intumescesse com mistura por 1 a 2 h. Após a evacuação do solvente intumescido, a resina foi lavada com diclorometano (2 x 1 a 2 min), diisopropiletilamina a 5% em isopropanol/diclorometano a 25% (2 x 3 a 4 min) e diclorometano (2 x 1 a 2 min). Após evacuação da lavagem final, a resina foi tratada com uma solução de âncora de dissulfureto 34 em 1-metil-2-pirrolidinona (0,17 M; 15 ml/g de resina, ~ 2,5 eq) e a mistura de resina/reagente foi aquecida a 45 °C por 60 horas. No final da reação, o aquecimento

foi interrompido e a solução de âncora foi evacuada e a resina foi lavada com 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3 a 4 min) e diclorometano (6 x 1 a 2 min). A resina foi tratada com uma solução de dicarbonato de dietila a 10% (em v/v) em diclorometano (16 ml/g; 2 x 5 a 6 min) e, então, lavada com diclorometano (6 x 1 a 2 min). A resina 39 foi seca sob uma corrente de N<sub>2</sub> por 1 a 3 h e, então, sob vácuo até peso constante ( $\pm$  2%). Rendimento: 110 a 150% do peso de resina original.

[0296]Determinação do Carregamento de resina de Aminometilpoliestireno-dissulfeto: O carregamento da resina (número de sítios reativos potencialmente disponíveis) é determinado por um ensaio espectrométrico para o número de grupos trifenilmetila (tritila) por grama de resina.

[0297][29]Um peso conhecido de resina seca ( $25 \pm 3$  mg) é transferido para um frasco volumétrico de 25 ml silanizado e são adicionados  $\sim$  5 ml de ácido trifluoroacético a 2% (em v/v) em diclorometano. O conteúdo é misturado por agitação suave e, então, deixado em repouso por 30 min. O volume é levado até 25 ml com ácido trifluoroacético a 2% (em v/v) adicional em diclorometano e o conteúdo completamente misturado. Com o uso de uma pipeta de deslocamento positivo, uma alíquota da solução contendo tritila (500  $\mu$ l) é transferida para um frasco volumétrico de 10 ml e o volume é levado até 10 ml com ácido metanossulfônico.

[0298]O teor de cátion tritila na solução final é medido por absorvância de UV a 431,7 nm e o carregamento de resina calculado em grupos tritila por grama de resina ( $\mu$ mol/g) com o uso dos volumes, diluições, coeficiente de extinção ( $\epsilon$ : 41  $\mu$ mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) e peso de resina apropriados. O ensaio é realizado em triplicata e um carregamento médio é calculado.

[0299]O procedimento de carregamento da resina nesse exemplo fornecerá à resina um carregamento de aproximadamente 500  $\mu$ mol/g. Obteve-se um carregamento de 300 a 400  $\mu$ mol/g se a etapa de incorporação de âncora de dissulfureto for realizada durante 24 horas à temperatura ambiente.

[0300]Carregamento de Cauda: Com o uso da mesma configuração e volumes que para a preparação de resina de dissulfureto de aminometilpoliestireno, a Cauda pode ser introduzida em suporte sólido. A resina carregada com âncora foi primeiro desprotegida sob condições ácidas e o material resultante foi neutralizado antes do acoplamento. Para a etapa de acoplamento, foi usada uma solução de 38 (0,2 M) em DMI contendo 4-etilmorfolina (NEM, 0,4 M) em vez da solução de âncora de dissulfureto. Após 2 h a 45 °C, a resina 39 foi lavada duas vezes com diisopropiletilamina a 5% em isopropanol a 25%/diclorometano e uma vez com DCM. À resina foi adicionada uma solução de anidrido benzoico (0,4 M) e NEM (0,4 M). Após 25 min, o revestimento do reator foi resfriado à temperatura ambiente e a resina foi lavada duas vezes com diisopropiletilamina a 5% em isopropanol a 25%/diclorometano e oito vezes com DCM. A resina 40 foi filtrada e seca sob alto vácuo. O carregamento para a resina 40 é definido como sendo o carregamento da resina original de dissulfureto de aminometilpoliestireno 39 usada no carregamento da Cauda.

[0301]Síntese de Fase Sólida: Os Oligômeros Morfolino foram preparados em um Sintetizador Automático de Peptídeos Gilson AMS-422 em colunas de reação de polipropileno de 2 ml de Gilson (Parte n° 3980270). Um bloco de alumínio com canais para o fluxo de água foi colocado ao redor das colunas enquanto as mesmas se assentavam no sintetizador. O AMS-422 adicionará alternativamente soluções de reagente/lavagem, manterá durante um período de tempo especificado e evacuará as colunas com o uso de vácuo.

[0302]Para oligômeros na faixa até cerca de 25 subunidades de comprimento, é preferencial a resina de dissulfureto de aminometilpoliestireno com carregamento próximo de 500 µmol/g de resina. Para oligômeros maiores, é preferencial a resina de dissulfureto de aminometilpoliestireno com carregamento de 300 a 400 µmol/g de resina. Se for desejada uma molécula com Cauda 5', a resina que foi carregada com a Cauda é escolhida com as mesmas diretrizes de carregamento.

[0303]Foram preparadas as seguintes soluções de reagente:

[0304]Solução de detritilação: Ácido Cianoacético a 10% (em p/v) em diclorometano/acetonitrila a 4:1;

[0305]Solução de Neutralização: Diisopropiletilamina a 5% em diclorometano/isopropanol a 3:1; e

[0306]Solução de Acoplamento: Subunidade de Morfolino ativada 0,18 M (ou 0,24 M para oligômeros com mais de 20 subunidades) da base e tipo de ligação desejados e N etilmorfolina 0,4 M, em 1,3-dimetilimidazolidinona.

[0307]Diclorometano (DCM) foi usado como uma lavagem transicional que separa as diferentes lavagens de solução de reagente diferentes.

[0308]No sintetizador, com o bloco ajustado em 42 °C, foi adicionado a cada coluna contendo 30 mg de resina de dissulfureto de aminometilpoliestireno (ou resina de Cauda) 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona e deixado descansar à temperatura ambiente por 30 min. Após a lavagem duas vezes com 2 ml de diclorometano, foi empregado o seguinte ciclo de síntese:

Etapa	Volume	Distribuição	Tempo de retenção
Detritilação	1,5 ml	Calabouço	15 segundos
Detritilação	1,5 ml	Calabouço	15 segundos
Detritilação	1,5 ml	Calabouço	15 segundos
Detritilação	1,5 ml	Calabouço	15 segundos
Detritilação	1,5 ml	Calabouço	15 segundos
Detritilação	1,5 ml	Calabouço	15 segundos
Detritilação	1,5 ml	Calabouço	15 segundos
DCM	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos

Etapa	Volume	Distribuição	Tempo de retenção
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
DCM	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Acoplamento	350 a 500 ul	Seringa	40 minutos
DCM	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
Neutralização	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
DCM	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
DCM	1,5 ml	Calabouço	30 segundos
DCM	1,5 ml	Calabouço	30 segundos

[0309]As sequências dos oligômeros individuais foram programadas no sintetizador de modo que cada coluna receba a solução de acoplamento apropriada (A,C,G,T,I) na sequência apropriada. Quando o oligômero em uma coluna tiver completado a incorporação de sua subunidade final, a coluna foi removida do bloco e um ciclo final foi realizado manualmente com uma solução de acoplamento composta por cloreto de 4-metoxitifenilmetila (0,32 M em DMI) contendo 4-etilmorfolina a 0,89 M.

[0310]Clivagem da resina e a remoção de bases e grupos protetores da estrutura principal: Após a metoxitritilação, a resina foi lavada 8 vezes com 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Adicionou-se um ml de uma solução de clivagem que consiste em 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 M e trietilamina 0,73 M em 1-metil-2-pirrolidinona, tampou-

se a coluna e a mesma foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 30 min. Após esse tempo, a solução foi drenada para um frasco Wheaton de 12 ml. A resina grandemente encolhida foi lavada duas vezes com 300 µl de solução de clivagem. Adicionou-se à solução 4,0 ml de amônia aquosa conc. (armazenada a -20 °C), o frasco tampado firmemente (com tampa de rosca revestida com Teflon), e a mistura foi balançada para misturar a solução. O frasco foi colocado em um forno a 45 °C durante 16 a 24 horas para efetuar a clivagem dos grupos protetores da base e da estrutura principal.

[0311]Purificação de produto cru: A solução de amonólise em frascos foi removida do forno e deixada resfriar até à temperatura ambiente. A solução foi diluída com 20 ml de amônia aquosa a 0,28% e passada através de uma coluna de 2,5x10 cm contendo resina Macroprep HQ (BioRad). Um gradiente de sal (A: amônia a 0,28% com B: cloreto de sódio 1 M em amônia a 0,28%; B a 0 a 100% em 60 min) foi usado para eluir o pico contendo metoxitritila. As frações combinadas foram reunidas e posteriormente processadas dependendo do produto desejado.

[0312]Demetoxitritilação de Oligômeros Morfolino: As fracções reunidas da purificação de Macroprep foram tratadas com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M para baixar o pH para 2,5. Após a mistura inicial, as amostras permaneceram à temperatura ambiente por 4 min, quando foram neutralizadas a pH 10 a 11 com amônia a 2,8%/água. Os produtos foram purificados por extração de fase sólida (SPE).

[0313]Empacotamento e condicionamento de coluna de SPE: Amberchrome CG-300M (Rohm e Haas; Filadélfia, PA, EUA) (3 ml) é empacotado em colunas de frita de 20 ml (Colunas de Cromatografia BioRad Econo-Pac (732-1011)) e a resina foi enxaguado com 3 ml do disposto a seguir: NH<sub>4</sub>OH a 0,28%/acetonitrila a 80%; NaOH 0,5 M/etanol a 20%; água; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM/acetonitrila 80%; água; NaOH 0,5/etanol a 20%; água; NH<sub>4</sub>OH a 0,28%.

[0314]Purificação de SPE: A solução da desmetoxitritilação foi carregada na

coluna e a resina foi lavada três vezes com 3 a 6 ml de amônia aquosa a 0,28%. Colocou-se um frasco Wheaton (12 ml) sob a coluna e o produto foi eluído por duas lavagens com 2 ml de acetonitrila a 45% em amônia aquosa a 0,28%.

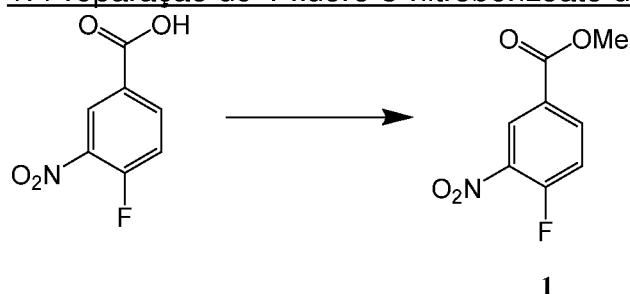
[0315]Isolamento de produto: As soluções foram congeladas em gelo seco e os frascos colocados em um liofilizador para produzir um pó branco macio. As amostras foram dissolvidas em água, filtradas através de um filtro de 0,22 micrôn (Pall Life Sciences, filtro de seringa Acrodisc de 25 mm, com uma membrana HT Tuffry de 0,2 micrôn) usando uma seringa e a Densidade Óptica (OD) foi medida em um espectrofotômetro de UV para determinar as unidades de OD do oligômero presente, bem como dispensar a amostra para análise. As soluções foram, então, colocadas novamente em frascos Wheaton para liofilização.

[0316]Analise de Oligômeros Morfolino por MALDI: A espectrometria de massa MALDI-TOF foi usada para determinar a composição de frações em purificações, bem como fornecer evidências para identidade (peso molecular) dos oligômeros. As amostras foram testadas após diluição com solução de ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (ácido sinapínico), 3,4,5-tri-hidroxiacetofenona (THAP) ou ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) como matrizes.

[0317]Método de síntese de PMO B: Uso de âncora de NCP2

[0318]Síntese de âncora de NCP2:

1. Preparação de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metila (1)



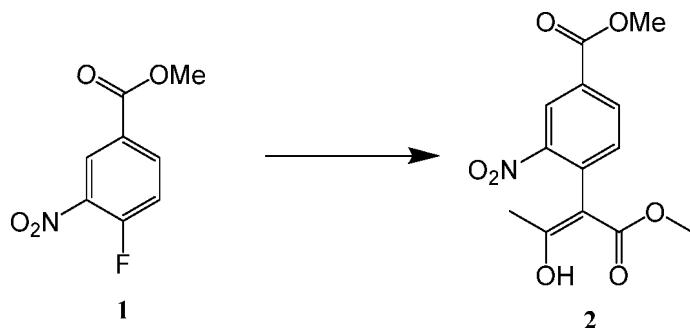
[0319]A um frasco de 100 l foi carregado com 12,7 kg de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico, adicionou-se 40 kg de metanol e 2,82 kg de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi agitada em refluxo (65 °C) durante 36 horas. A mistura de reação

foi resfriada até 0 °C. Os cristais formados a 38 °C. A mistura foi retida a 0 °C durante 4 h, então, filtrada sob nitrogênio. O frasco de 100 l foi lavado e a torta do filtro foi lavada com 10 kg de metanol que foi resfriada até 0 °C. A torta do filtro sólida foi seca no funil durante 1 hora, transferida para bandejas e seca em um forno a vácuo à temperatura ambiente a um peso constante de 13,695 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metila (100% de rendimento; HPLC 99%).

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

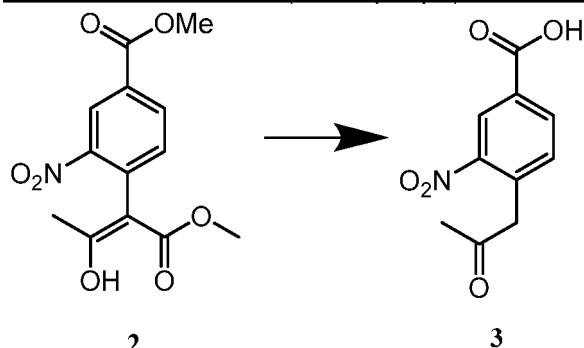
### A. 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-METILA

(2)



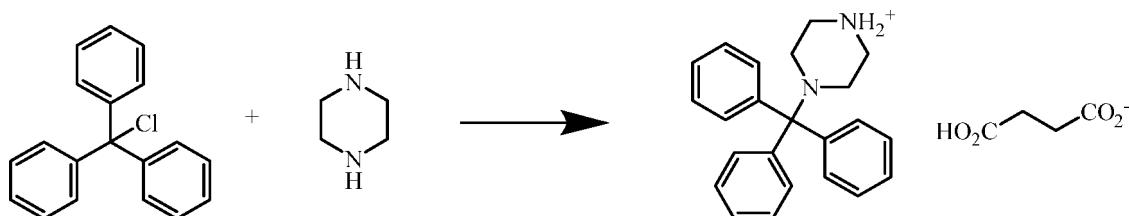
[0320]Um frasco de 100 l foi carregado com 3,98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metila (1) da etapa anterior, 9,8 kg de DMF, 2,81 kg de acetoacetato de metila. A mistura foi agitada e resfriada até 0 °C. A isto adicionou-se 3,66 kg de DBU durante cerca de 4 horas, enquanto a temperatura foi mantida em ou abaixo de 5 °C. A mistura foi agitada 1 hora adicional. Ao frasco de reação adicionou-se uma solução de 8,15 kg de ácido cítrico em 37,5 kg de água purificada, enquanto a temperatura de reação foi mantida em ou abaixo de 15 °C. Após a adição, a mistura de reação foi agitada 30 minutos adicionais, então, filtrada sob nitrogênio. A torta do filtro úmida foi retornada para o frasco de 100 l juntamente com 14,8 kg de água purificada. A pasta fluida foi agitada durante 10 minutos, então, filtrada. A torta úmida foi novamente retornada para o frasco de 100 l, transformada em pasta fluida com 14,8 kg de água purificada durante 10 minutos, e filtrada para 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metila bruto.

#### B. ÁCIDO 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico



[0321]O 4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de (Z)-metila bruto foi carregado em um frasco de reação de 100 l sob nitrogênio. A isso adicionou-se 14,2 kg de 1,4-dioxano e agitou-se. À mistura adicionou-se uma solução de 16,655 kg de HCl concentrado e 13,33 kg de água purificada (HCl 6 M) durante 2 horas, enquanto que a temperatura da mistura de reação foi mantida abaixo de 15 °C. Quando a adição foi concluída, a mistura de reação foi aquecida a refluxo (80 °C) durante 24 horas, resfriada até a temperatura ambiente e filtrada sob nitrogênio. A torta do filtro sólida foi triturada com 14,8 kg de água purificada, filtrada, triturada novamente com 14,8 kg de água purificada e filtrada. O sólido foi retornado para o frasco de 100 l com 39,9 kg de DCM e refluxado com agitação durante 1 hora. 1,5 kg de água purificada foi adicionado para dissolver os sólidos restantes. A camada orgânica de fundo foi dividida em um frasco de 72 l pré-aquecido, então, retornada para um frasco de 100 l seco limpo. A solução foi resfriada até 0 °C, retida durante 1 hora, então, filtrada. A torta do filtro sólida foi lavada duas vezes cada com uma solução de 9,8 kg de DCM e 5 kg de heptano, então, seca no funil. O sólido foi transferido para bandejas e seco a um peso constante de 1,855 kg de ácido 3-Nitro-4-(2-oxopropil)benzoico. Rendimento geral de 42% do composto 1. HPLC 99,45%.

### 3. Preparação de succinato de n-tritilpiperazina (ntp)



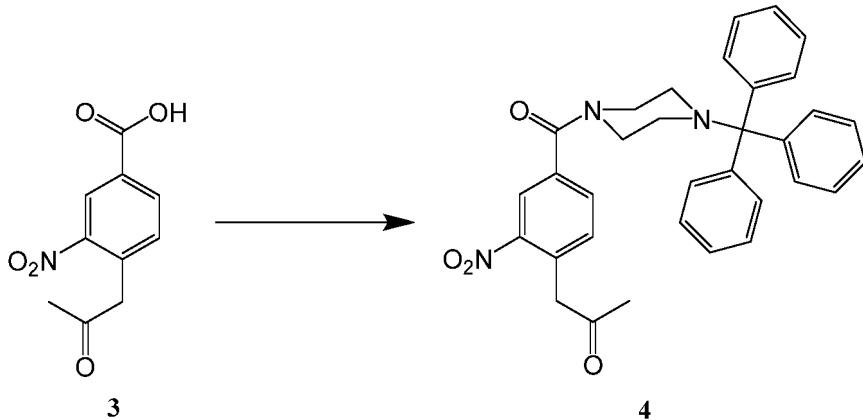
[0322] A um frasco encamisado de 72 l foi carregado sob nitrogênio com 1,805 kg de cloreto de trifenilmetila e 8,3 kg de tolueno (solução TPC). A mistura foi agitada até os sólidos dissolverem. A um frasco de reação encamisado de 100 l foi adicionado, sob nitrogênio, 5,61 kg de piperazina, 19,9 kg de tolueno e 3,72 kg de metanol. A mistura foi agitada e resfriada até 0 °C. A isso adicionou-se lentamente em porções a solução TPC durante 4 horas, enquanto que a temperatura de reação foi mantida em ou abaixo de 10 °C. A mistura foi agitada durante 1,5 horas a 10 °C, então, deixada para aquecer até 14 °C. 32,6 kg de água purificada foram carregados no frasco de 72 l, então, transferidos para o frasco de 100 l, enquanto que a temperatura de lote interno foi mantida a 20 +/- 5 °C. As camadas foram deixadas para dividir e a camada aquosa de fundo foi separada e armazenada. A camada orgânica foi extraída três vezes com 32 kg de água purificada cada e as camadas aquosas foram separadas e combinadas com a solução aquosa armazenada.

[0323] A camada orgânica restante foi resfriada até 18 °C e uma solução de 847 g de ácido succínico em 10,87 kg de água purificada foi adicionada lentamente em porções à camada orgânica. A mistura foi agitada durante 1,75 horas a 20 +/- 5 °C. A mistura foi filtrada e os sólidos foram lavados com 2 kg de TBME e 2 kg de acetona, então, secos no funil. A torta do filtro foi triturada duas vezes com 5,7 kg cada de acetona e filtrada e lavada com 1 kg de acetona entre triturações. O sólido foi seco no funil, então, transferido para bandejas e seco em um forno a vácuo à temperatura ambiente a um peso constante de 2,32 kg de NTP. Rendimento de 80%.

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

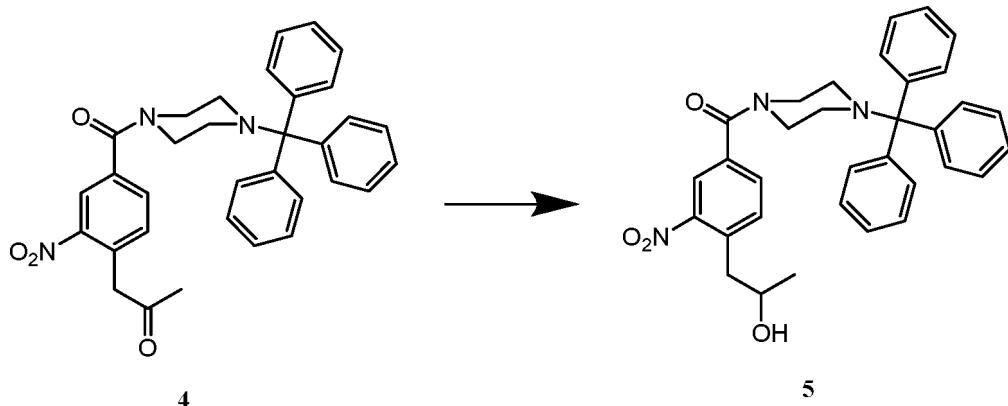
##### a. PREPARAÇÃO DE 1-(2-nitro-4(4-tritilpiperazina-1-carbonil)fenil)propan-2-

ona



[0324] A um frasco encamisado de 100 l foram carregados sob nitrogênio 2 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico (3), 18,3 kg de DCM e 1,845 kg de cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl). A solução foi agitada até que uma mistura homogênea fosse formada. 3,048 kg de NTP foram adicionados durante 30 minutos à temperatura ambiente e agitados por 8 horas. 5,44 kg de água purificada foram adicionados à mistura de reação e agitados por 30 minutos. As camadas foram deixadas separar e a camada orgânica de fundo que contém o produto foi drenada e armazenada. A camada aquosa foi extraída duas vezes com 5,65 kg de DCM. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução de 1,08 kg de cloreto de sódio em 4,08 kg de água purificada. As camadas orgânicas foram secas com 1,068 kg de sulfato de sódio e filtradas. O sulfato de sódio foi lavado com 1,3 kg de DCM. As camadas orgânicas combinadas foram transformadas em pasta fluida com 252 g de gel de sílica e filtradas através de um funil de filtro que contém um leito de 252 g de gel de sílica. O leito de gel de sílica foi lavado com 2 kg de DCM. As camadas orgânicas combinadas foram evaporadas em um rotovap. 4,8 kg de THF foram adicionados ao resíduo e, então, evaporados no rotovap até que 2,5 volumes do 1-(2-nitro-4-(4-tritylpiperazin-1-yl)fenil)propan-2-ona bruto em THF fosse alcançado.

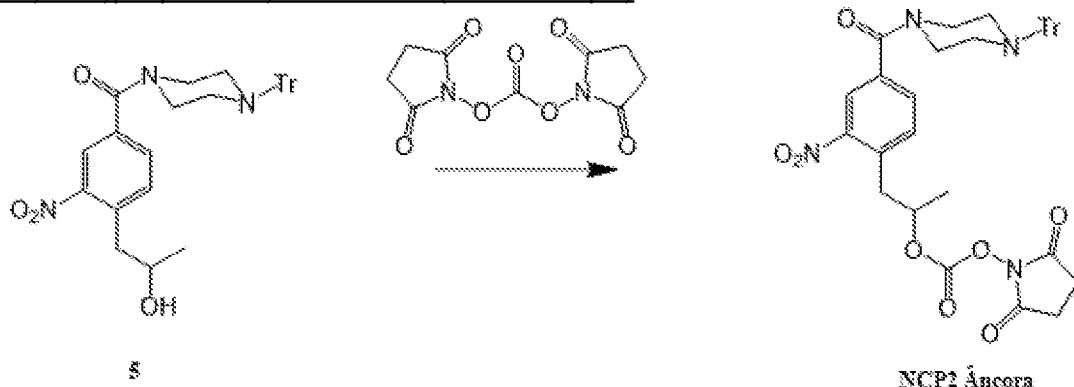
**B. PREPARAÇÃO DE (4-(2-hidroxipropil)-3-nitrofenil)(4-tritylpiperazin-1-il)metanona (5)**



[0325]A um frasco encamisado de 100 l foi carregado sob nitrogênio 3.600 g de 4 da etapa anterior e 9.800 g de THF. A solução agitada foi resfriada para  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ . A solução foi diluída com 11.525 g de etanol e 194 g de boroidreto de sódio foram adicionados durante cerca de 2 horas a  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ . A mistura de reação foi agitada 2 horas adicionais a  $\leq 5^{\circ}\text{C}$ . A reação foi bruscamente arrefecida com uma solução de cerca de 1,1 kg de cloreto de amônio em cerca de 3 kg de água por meio de adição lenta para manter a temperatura a  $\leq 10^{\circ}\text{C}$ . A mistura de reação foi agitada 30 minutos adicionais, filtrada para remover inorgânicos, e recarregada em um frasco encamisado de 100 l e extraída com 23 kg de DCM. A camada orgânica foi separada e a aquosa foi duas vezes mais extraída com 4,7 kg de DCM cada. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com uma solução de cerca de 800 g de cloreto de sódio em cerca de 3 kg de água, então, secas com 2,7 kg de sulfato de sódio. A suspensão foi filtrada e a torta do filtro foi lavada com 2 kg de DCM. Os filtrados combinados foram concentrados a 2,0 volumes, diluídos com cerca de 360 g de acetato de etila, e evaporados. O produto bruto foi carregado em uma coluna de gel de sílica de 4 kg de sílica recheada com DCM sob nitrogênio e eluída com 2,3 kg de acetato de etila em 7,2 kg de DCM. As frações combinadas foram evaporadas e o resíduo foi tomado em 11,7 kg de tolueno. A solução de tolueno foi filtrada e a torta do filtro foi lavada duas vezes com 2 kg de tolueno cada. A torta do filtro foi seca a um peso constante de 2,275 kg de composto 5 (46% de rendimento do composto 3) HPLC 96,99%.

#### 5. Preparação de 2,5-dioxopirrolidin-1-il(1-(2-nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazina-

1 carbonil)fenil)propan-2-il) carbonato (âncora ncp2)



[0326]A um frasco encamisado de 100 l foram carregados sob nitrogênio 4,3 kg de composto 5 (peso ajustado com base no tolueno residual por RMN de H<sup>1</sup>; todos os reagentes doravante foram escalonados consequentemente) e 12,7 kg de piridina. A isso foram carregados 3,160 kg de DSC (78,91% em peso por RMN de H<sup>1</sup>), enquanto que a temperatura interna foi mantida a ≤ 35 °C. A mistura de reação foi envelhecida durante cerca de 22 horas no ambiente, então, filtrada. A torta do filtro foi lavada com 200 g de piridina. Em dois lotes que compreendem, cada um, ½ do volume de filtrado, a lavagem de filtrado foi carregada lentamente em um frasco encamisado de 100 l que contém uma solução de cerca de 11 kg de ácido cítrico em cerca de 50 kg de água e agitada por 30 minutos para permitir a precipitação de sólido. O sólido foi coletado com um funil de filtro, lavado duas vezes com 4,3 kg de água por lavagem, e seco no funil de filtro sob vácuo.

[0327]Os sólidos combinados foram carregados em um frasco encamisado de 100 l e dissolvidos em 28 kg de DCM e lavados com uma solução de 900 g de carbonato de potássio em 4,3 kg de água. Após 1 hora, as camadas foram permitidas separar e a camada aquosa foi removida. A camada orgânica foi lavada com 10 kg de água, separada e seca com 3,5 kg de sulfato de sódio. O DCM foi filtrado, evaporado e seco a vácuo a 6,16 kg de Âncora de NCP2 (114% de rendimento).

## Síntese de resina carregada em âncora de Ncp2

[0328]A um reator de síntese em fase sólida de 75 l com uma torneira de Teflon foram carregados cerca de 52 l de NMP e 2.300 g de resina de aminometil poliestireno. A resina foi agitada no NMP para expandir por cerca de 2 horas, então, drenada. A resina foi lavada duas vezes com cerca de 4 l de DCM por lavagem, então, duas vezes com 39 l de solução de neutralização por lavagem, então, duas vezes com 39 l de DCM por lavagem. A solução de âncora de NCP2 foi lentamente adicionada à solução de resina de agitação, agitada por 24 horas à temperatura ambiente e drenada. A resina foi lavada quatro vezes com 39 l de NMP por lavagem e seis vezes com 39 l de DCM por lavagem. A resina foi tratada e agitada com ½ da solução de cobertura DEDC por 30 minutos, drenada e foi tratada e agitada com a 2<sup>a</sup> ½ da solução de cobertura DEDC por 30 minutos e drenada. A resina foi lavada seis vezes com 39 l de DCM por lavagem, então, seca em um forno ao peso constante de 3.573,71 g de resina carregada em âncora.

[0329]Preparação de oligômero de morfolino com o uso de âncora de NCP2

[0330]Síntese em fase sólida a 50 l de Substância de fármaco Golodirsen (PMO nº 1)

### 1. Materiais

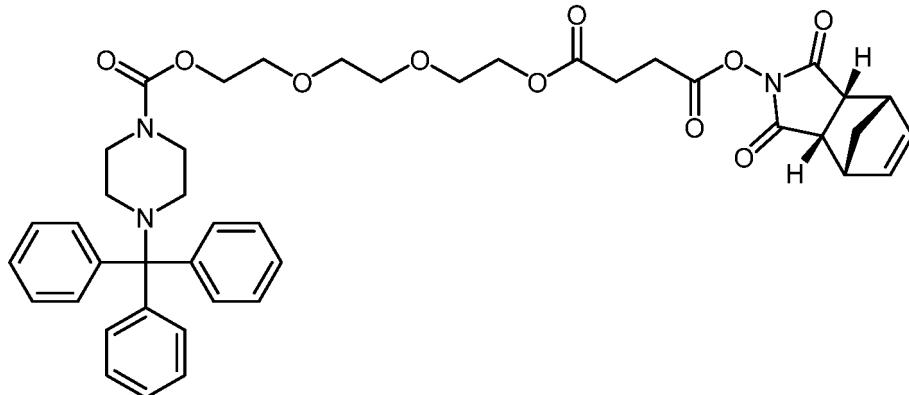
Tabela 2: materiais de partida

Nome de Material	Nome químico	Número CAS	Fórmula química	Peso Molecular
Subunidade A ativada	Ácido fosfamidoclorídico, éster <i>N,N</i> -dimetil-, [6-[6-(benzóilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico	1155373-30-0	C <sub>38</sub> H <sub>37</sub> CIN <sub>7</sub> O <sub>4</sub> P	722,2
Subunidade C ativada	Ácido fosforamidoclorídico, éster <i>N,N</i> -dimetil-, [6-[4-(benzóilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico	1155373-31-1	C <sub>37</sub> H <sub>37</sub> CIN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> P	698,2
Subunidade	Ácido propanoico, éster 2,2-dimetil-, 4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino)fosfinil]oxi]metil]-	1155309-89-9	C <sub>51</sub> H <sub>53</sub> CIN <sub>7</sub> O <sub>7</sub> P	942,2

Nome de Material	Nome químico	Número CAS	Fórmula química	Peso Molecular
DPG ativada	4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenílico			
Subunidade T ativada	Ácido fosforamidoclorídico, éster N,N-dimetil-, [6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metílico	1155373-34-4	C <sub>31</sub> H <sub>34</sub> CIN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> P	609,1
Cauda de EG3 ativada	Ácido butanodioico, 1-[3aR,4S,7R,7aS]-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il] 4-[2-[2-[2-[[[4-(trifenilmetil)-1-piperazinil]carboxnil]oxi]etoxi]etoxi]etil]	1380600-06-5	C <sub>43</sub> H <sub>47</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	765,9

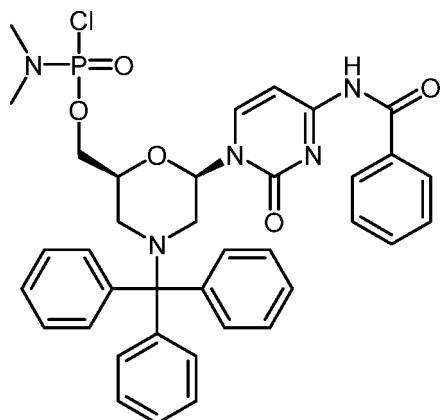
[0331]Estruturas químicas de materiais de partida:

A. CAUDA DE eg3 ATIVADA



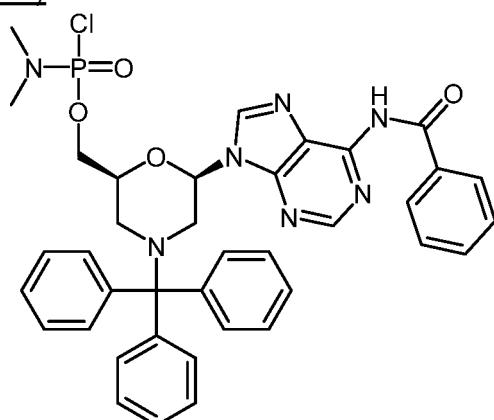
B. SUBUNIDADE c ativada (para preparação, consultar patente nº u.s.

8.067.571)

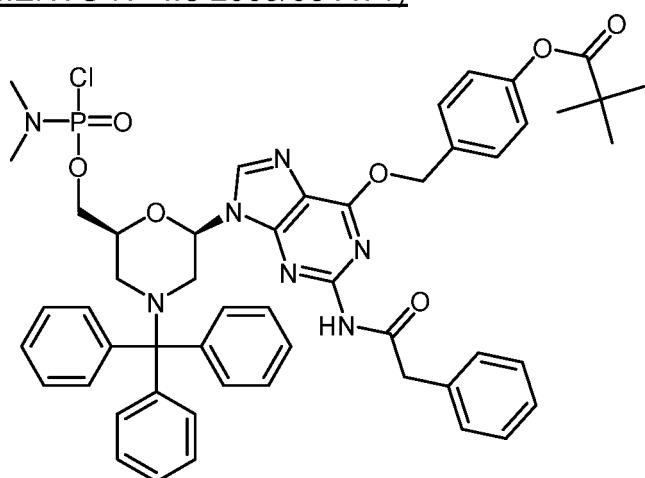


C. SUBUNIDADE a ativada (para preparação, consultar patente nº u.s.

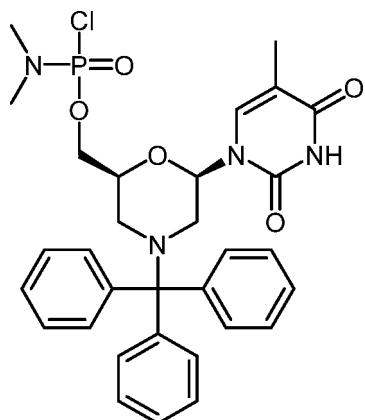
8.067.571)



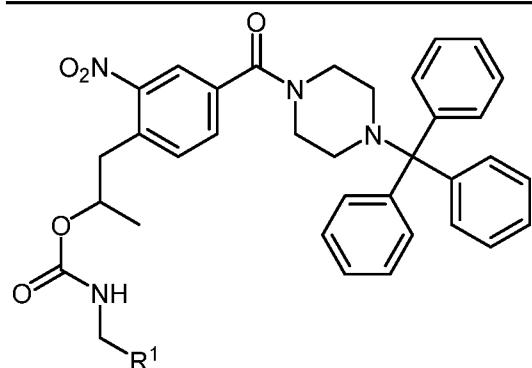
D. SUBUNIDADE dpg ATIVADA (para preparação, CONSULTAR DOCUMENTO N° wo 2009/064471)



E. SUBUNIDADE t ATIVADA (para preparação, CONSULTAR wo 2013/082551)



F. RESINA CARREGADA EM ÂNCORA



[0332]em que R<sup>1</sup> é um meio de suporte.

Tabela 3: descrição de soluções para síntese de oligômero de fase sólida de substância de fármaco bruta Golodirsen

Nome de solução	Composição de solução
Solução de âncora de NCP2	37,5 l de NMP e 1.292 g de âncora de NCP2
Solução de cobertura DEDC	4,16 l de Dicarbonato de Dietila (DEDC), 3,64 l de NEM e 33,8 l de DCM
Solução de CYTFA	2,02 kg de 4-cianopiridina, 158 l de DCM, 1,42 l de TFA, 39 l de TFE e 2 l de água purificada
Solução de neutralização	35,3 l de IPA, 7,5 l de DIPEA e 106,5 l de DCM

Nome de solução	Composição de solução
Solução de clivagem	1.530,04 g de DTT, 6,96 l de NMP e 2,98 l de DBU

## 2. Síntese de substância de fármaco bruta Golodirsen

### A. Expansão de resina

[0333] 750 g de resina carregada em âncora e 10,5 l de NMP foram carregados em um 50 l de reator silanizado e agitada durante 3 horas. O NMP foi drenado e a resina carregada em âncora foi lavada duas vezes com 5,5 l cada de DCM e duas vezes com 5,5 l cada um de 30% de TFE/DCM.

### B. CICLO 0: acoplamento de cauda de eg3

[0334] A resina carregada em âncora foi lavada três vezes com 5,5 l cada de 30% de TFE/DCM e drenado, lavado com 5,5 l de solução de CYFTA para 15 minutos e drenada, e novamente lavado com 5,5 l de solução de CYFTA por 15 minutos sem drenagem na qual 122 ml de NEM/DCM a 1:1 foram carregados e a suspensão agitada por 2 minutos e drenada. A resina foi lavada duas vezes com 5,5 l de solução de neutralização por 5 minutos e drenada, então, duas vezes com 5,5 l cada de DCM e drenada. Uma solução de 706,2 g de cauda de EG3 ativada (MW 765,85) e 234 ml de NEM em 3 l de DMI foram carregados na resina e agitados por 3 horas em RT e drenados. A resina foi lavada duas vezes com 5,5 l cada de solução de neutralização por 5 minutos por cada lavagem, e uma vez com 5,5 l de DCM e drenada. Uma solução de 374,8 g de anidrido benzoico e 195 ml de NEM em 2.680 ml de NMP foram carregados e agitados por 15 minutos e drenados. A resina foi agitada com 5,5 l de solução de neutralização por 5 minutos, então, lavada uma vez com 5,5 l de DCM e duas vezes com 5,5 l cada de 30% de TFE/DCM. A resina foi suspensa em 5,5 l de 30% de TFE/DCM e retida por 14 horas.

### C. Ciclos de acoplamento de subunidade 1-30

#### I. Tratamentos de pré-acoplamento

[0335]Antes de cada ciclo de acoplamento conforme descrito na Figura 18, a resina foi: 1) lavada com 30% de TFE/DCM; 2) a) tratada com solução de CYTFA 15 minutos e drenada, e b) tratada com solução de CYTFA por 15 minutos na qual foi adicionado NEM/DCM a 1:1, agitada, e drenada; 3) agitada três vezes com solução de neutralização; e 4) lavada duas vezes com DCM. Consultar a Figura 18.

## II. Tratamentos pós-acoplamento

[0336]Depois que cada solução de subunidade foi drenada, conforme descrito na Figura 18, a resina foi: 1) lavada com DCM; e 2) lavada duas vezes com 30% de TFE/DCM. Se a resina for retida durante um período de tempo antes do próximo ciclo de acoplamento, a segunda lavagem de TFE/DCM não foi drenada e a resina foi retida na dita solução de lavagem de TFE/DCM. Consultar a Figura 18.

## III. Ciclos de acoplamento de subunidade ativada

[0337]Os ciclos de acoplamento foram realizados, conforme descrito na Figura 18.

## IV. Lavagem de ipa final

[0338]Depois que etapa de acoplamento final foi realizada conforme descrito na Figura 18, a resina foi lavada 8 vezes com 19,5 l cada de IPA, e seca a vácuo à temperatura ambiente durante cerca de 63,5 horas a um peso seco de 4.857,9 g.

## C. Clivagem

[0339]A substância de fármaco bruta Golodirsen ligada por resina acima foi dividida em dois lotes, cada lote foi tratado conforme exposto a seguir. Um lote de 1.619,3 g de resina foi: 1) agitado com 10 l de NMP por 2 h, então, o NMP foi drenado; 2) lavado três vezes com 10 l cada de 30% de TFE/DCM; 3) tratado com 10 l de solução de CYTFA por 15 minutos; e 4) 10 l de solução de CYTFA por 15 minutos na qual 130 ml de NEM/DCM a 1:1 foram, então, adicionados e agitados por 2 minutos e drenados. A resina foi tratada três vezes com 10 l cada de solução de neutralização, lavada seis vezes com 10 l de DCM, e oito vezes com 10 l cada de NMP. A resina foi

tratada com uma solução de clivagem de 1.530,4 g de DTT e 2.980 de DBU em 6,96 l de NMP por 2 horas para separar a substância de fármaco bruta Eteplirsen da resina. A solução de clivagem foi drenada e retida em um recipiente separado. O reator e resina foram lavados com 4,97 l de NMP que foi combinada com a solução de clivagem.

#### D. Desproteção

[0340]A lavagem de NMP e solução de clivagem combinada foram transferidas para um vaso de pressão no qual foram adicionados 39,8 l de NH<sub>4</sub>OH (NH<sub>3</sub>•H<sub>2</sub>O) que foram resfriados a uma temperatura de -10 °C a -25 °C em um congelador. O vaso de pressão foi vedado e aquecido até 45 °C por 16 h, então, deixada resfriar até 25 °C. Essa solução de desproteção que contém a substância de fármaco bruta Golodirksen foi diluída 3:1 com água purificada e pH ajustado para 3,0 com ácido fosfórico 2 M, então, para pH 8,03 com NH<sub>4</sub>OH. HPLC (C18) 77,552% e SCX-10 73,768%.

[0341]Purificação de substância de fármaco bruto Golodirsen (PMO nº 1)

[0342]A solução de desproteção da parte D acima, que contém a substância de fármaco bruta Golodirsen foi carregada em uma coluna de resina de troca aniónica ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) e eluída com um gradiente de 0 a 35% de B em volume de coluna 17 (Tampão A: hidróxido de sódio 10 mM; Tampão B: cloreto de sódio 1 M em hidróxido de sódio 10 mM) e frações de pureza aceitável (C18 e SCX HPLC) foram agrupados a uma solução de produto de fármaco purificado. HPLC : 93,571 4% (C18) 88,270 % (SCX).

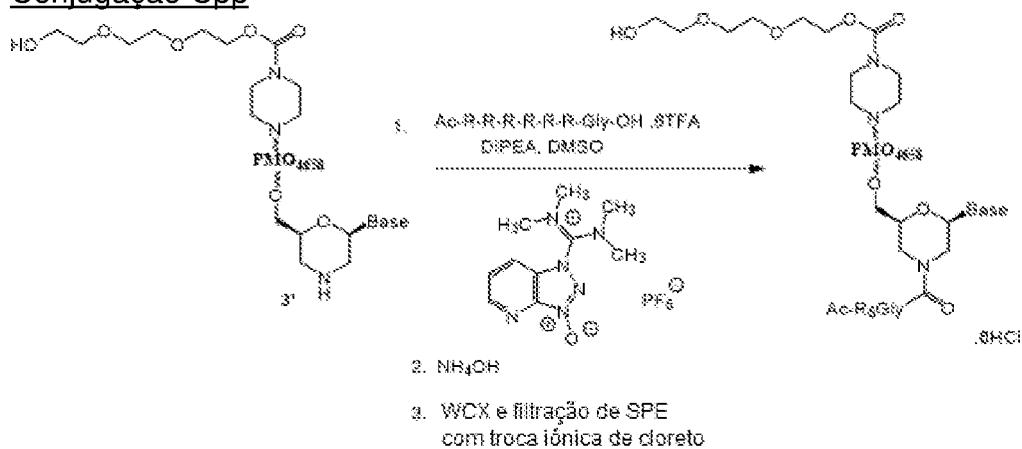
[0343]A substância de fármaco purificada foi dessalinizada e liofilizada para 1450.72 g de substância de fármaco Golodirsen purificada. Rendimento de 54,56 %; HPLC: 93,531 7% (C18) 88,354% (SCX).

Tabela 5. Acrônimos

Acrônimo	Nome
DBU	1,8-Diazabiciclo[4.1.0]hept-5-eno

Acrônimo	Nome
DCM	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMI	1,3-Dimetil-2-imidazolidinona
DTT	Diitiotreitol
IPA	Álcool isopropílico
MW	Peso Molecular
NEM	N-Etilmorfolina
NMP	N-Metil-2-pirrolidona
RT	Temperatura ambiente
TFA	Ácido 2,2,2-trifluoroacético
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol

### Conjugação Cpp



[0344]Procedimentos analíticos: Os espectros de massa de tempo de vôo de dessorção/ionização a laser assistida por matriz (MALDI-TOF-MS) foram registrados em um Bruker AutoflexTM Speed, com o uso de uma matriz de ácido sinapínico (SA).

SCX-HPLC foi realizado em um sistema Thermo Dionex UltiMate 3000 equipado com um detector de matriz de diodo 3000 e uma coluna ProPacTM SCX-20 (250 x 4 mm) com o uso de uma taxa de vazão de 1,0 ml/min (pH = 2; temperatura da coluna 30 °C). As fases móveis foram A (25% de acetonitrila em água que contém H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 24 mM) e B (25% de acetonitrila em água que contém KCl 1 M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 24 mM). A eluição gradiente foi empregada: 0 min, 35% de B; 2 min, 35% de B; 22 min, 80% de B; 25 min, 80% de B; 25,1 min, 35% de B; 30 min, 35% de B.

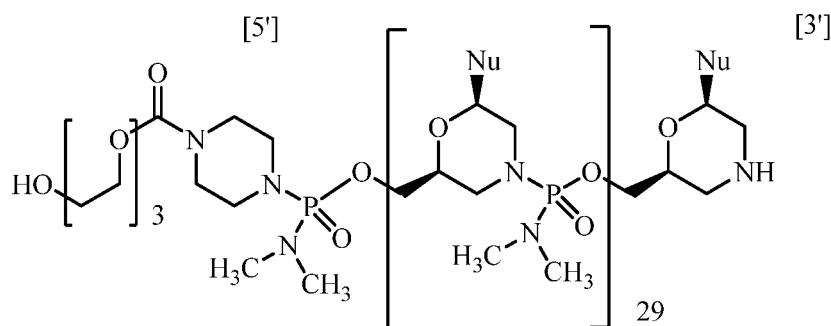
[0345]A uma mistura do PMO nº 1 (1,82 g, 0,177 mmol, recém seca por liofiliação durante dois dias), Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH hexatrifluoroacetato (614,7 mg, 0,354 mmol) e 1-[Bis(dimetilamino)métileno]-1*H*-1,2,3-triazolo[4,5-*b*]piridínio 3-óxido hexafluorofosfato (HATU, 134,4 mg, 0,354 mmol) adicionou-se dimetilsulfóxido (DMSO, 20 ml). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 minutos, então, *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA, 68,5 mg, 0,530 mmol) foi adicionada. Após 5 minutos, a mistura turva se tornou uma solução transparente. A reação foi monitorada por SCX-HPLC. Após 2 horas, foram adicionados 20 ml de solução de hidróxido de amônio a 10% (2,8% de NH<sub>3</sub>). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 2 horas adicionais. A reação foi terminada por meio da adição de 400 ml de água. Trifluoroetanol (2,0 ml) foi adicionado à solução.

[0346]A solução foi dividida em duas porções e cada porção foi purificada por uma coluna WCX (10 g de resina por coluna). Cada coluna WCX foi primeiramente lavada com acetonitrila a 20% em água (v/v) para remover o material de partida PMO nº 1. As lavagens (225 ml para cada coluna) foram interrompidas quando a análise de espectro de massa MALDI-TOF mostrou a ausência de sinal de PMO nº 1. Cada coluna foi então lavada com água (100 ml por coluna). O produto desejado, PPMO nº 1, foi eluído por guanidina HCl 2,0 M (140 ml para cada coluna). As soluções purificadas de PPMO nº 1 foram agrupadas em conjunto e, então, dividida em duas porções e cada uma dessalinizada por uma coluna SPE (10 g de resina para cada coluna).

[0347] A coluna SPE foi primeiramente lavada com solução aquosa de NaCl 1,0 M (100 ml para cada coluna) para gerar o sal de hexacloridrato de PPMO nº 1. Cada coluna SPE foi, então, lavada com água (200 ml para cada coluna). O PPMO nº 1 dessalinizado final foi eluído por 50% de acetonitrila em água (v/v, 150 mL para cada coluna). A acetonitrila foi removida por evacuação em pressão reduzida. A solução aquosa resultante foi liofilizada para obter o conjugado desejado hexacloridrato de PPMO nº 1 (1,93 g, 94,5% de rendimento).

#### Exemplo 1: Pmo nº 1

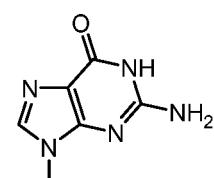
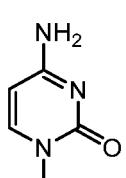
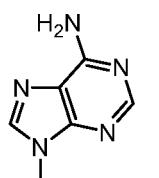
[0348] Com o uso do protocolo de método B de síntese de PMO descrito acima, PMO nº 1 foi sintetizado:



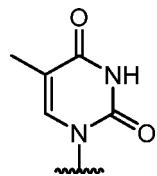
PMO nº 1

em que cada Nu de 1 a 25 e 5' a 3' é:

Posição No. 5' a 3'	Nu								
1	G	6	C	11	G	16	G	21	T
2	T	7	T	12	T	17	A	22	G
3	T	8	C	13	T	18	A	23	T
4	G	9	C	14	C	19	G	24	T
5	C	10	G	15	T	20	G	25	C



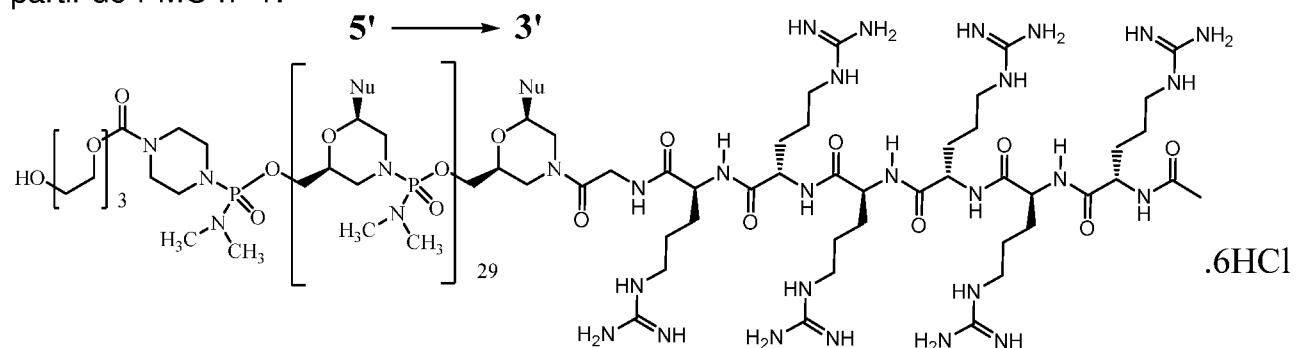
[0349] em que A é , C é , G é , e T é



[0350]HPLC: 71,85%; Condições: Dionex DNAPac (DNX#97) Gradiente: 75%A + 20%B + 5%C em 0 min; 50%A em 20 min; 25%A + 75%C em 21 min; Fase móvel A: 10mM NaOH/20mM NaCl; C: 10mM NaOH/0,5 M NaCL. Temp de coluna: 45C; Taxa de vazão 1,0 mL/min.

#### Exemplo 2: ppmo nº 1

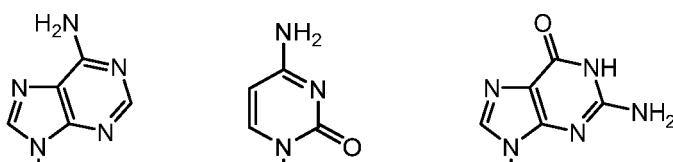
[0351]Com o uso do protocolo descrito acima, PPMO nº 1 foi sintetizado a partir de PMO nº 1:



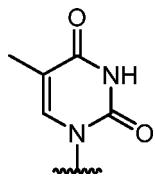
#### PPMO nº 1

em que cada Nu de 1 a 25 e 5' a 3' é:

Posição No. 5' a 3'	Nu								
1	G	6	C	11	G	16	G	21	T
2	T	7	T	12	T	17	A	22	G
3	T	8	C	13	T	18	A	23	T
4	G	9	C	14	C	19	G	24	T
5	C	10	G	15	T	20	G	25	C



[0352]em que A é , C é , G é , e T é



Exemplo 3: salto de éxon 53 *in vitro* (mioblastos)

[0353] Dois dos compostos que alvejam o éxon de distrofina humana (*DMD*) 53 conforme descrito na tabela abaixo, PMO#1 e PPMO#1 ambos contêm a mesma sequência, foram avaliados para salto de éxon 53 *DMD* em mioblastos humanos saudáveis.

Sequências de PMO#1 e PPMO#1 para éxon 53 DMD humano.

Nome	Sequência de alvejamento (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO nº 1	GTTGCCTCCGGTTCTGAA GGTGTTC	1	EG3	H
PPMO nº 1	GTTGCCTCCGGTTCTGAA GGTGTTC	1	EG3	-G-R <sub>6</sub>

[0354] Especificamente, mioblastos humanos saudáveis (passagens 5 a 6, SKB-F-SL adquirido a partir de Zen-Bio, Inc.) foram transferidos para placa a cerca de 40% de confluência quando tratados com PMO nº 1 ou PPMO nº 1 em várias concentrações (isto é, 40 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2,5 µm, e 1,25 µm) em meios SKM-M (Zen-Bio, Inc.). Após noventa e seis horas de incubação, os mioblastos foram lavados com PBS e lisados por tampão de lise de RA1 no kit Illustra GE RNAspin 96 (nº de cat. 25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). O total de RNA foi isolado de acordo com a recomendação do fabricante, exceto por 40µL de água livre de RNase terem sido usados para eluir RNA.

[0355] Para determinar o salto de éxon 53 por ambos os compostos, RT-PCR de ponto final de duas etapas foi realizada. Especificamente, onze microlitros de RNA

total foram primeiro transcritos de modo reverso a cDNA pelo kit de síntese SuperScript IV First-strand (nº de cat. 18091200, Invitrogen) com o uso de hexâmeros aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante. PCR foi realizada adicionando-se 9 µL de cDNA em Platinum Taq DNA polymerase PCR Supermix High Fidelity (nº de Cat. 12532024, Invitrogen) com iniciadores que alvejaram a junção de éxons 51/52 e 54 de *DMD* humana [iniciador direto (SEQ ID NO: 5): CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG; iniciador reverso (SEQ ID NO: 6): CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC]. A amplificação de PCR foi realizada com o uso de termociclador em tempo real BioRad CFX96 com o uso do programa mostrado na Tabela 2. A expressão dos produtos de PCR saltados ou não saltados foi avaliada carregando-se 32 µL de produto de PCR no sistema LabChip GX com o uso de kit de Reagente de Alta Sensibilidade de DNA (CLS760672, Perkin Elmer). A porcentagem de salto de éxon 53 de DMD foi calculada como a porcentagem da molaridade (nmol/l) para a banda saltada de éxon 53 (201 bp) em comparação com a molaridade de soma para as bandas saltadas (201 bp) e as não saltadas (413 bp).

[0356]O teste t de Student de duas caudas (homoscedástico) foi usado para avaliar a possibilidade dos meios dos 2 grupos serem estatisticamente diferentes um do outro em cada dose. O valor  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significante.

Programa termociclador usado para amplificar amplicons de *dmd* com ou sem o salto de éxon 53

Etapa	Temperatura	Tempo
1. Desnaturar	94 °C	2 min
2. Desnaturar	94 °C	30 s
3. Anelamento	61,2 °C	30 s
4. Estender	68 °C	1 min

Etapa	Temperatura	Tempo
5. Repetir etapas 2 a 4	34 ciclos	
6. Extensão Final	68 °C	5 min
7. Armazenar	4 °C	∞

[0357]Os resultados são apresentados na tabela abaixo e na Figura 4. Na figura 4, barras de erros apresentam média ± SD, “[Número] x” acima das barras denota a alteração de vezes relativa em porcentagem de salto de éxon por PPMO#1 comparado a PMO#1 em cada concentração, e “\*\*” indica uma diferença significativa entre PMO#1 e PPMO#1 com p-valor < 0,05.

#### PORCENTAGEM DE SALTO DE ÉXON 53 DE DMD POR PMO Nº 1 E PPMO

##### Nº 1 EM MIOBLASTOS HUMANOS

Composto/ Dose (μm)	Porcentagem de Salto de Éxon (média ± SD)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
PMO#1	1,27±0,2 4	2,19±0,4 4	3,58±0,9 1	6,56±1,32 8	11,06±2,0 8	19,57±4,2 3
PPMO#1	2,03±0,4 8	3,73±0,7 0	6,57±1,4 7	10,27±2,7 8	17,08±4,6 1	26,90±4,7 8

[0358]Os dados na tabela anterior e na Figura 4 mostram, surpreendentemente, que um salto de éxon 53 significativamente maior resulta em mioblastos quando as células forem tratadas com PPMO#1 conforme comparado a PMO#1 em todas as concentrações, cujo grau é inesperado. Esse aperfeiçoamento significativo provavelmente será adicionalmente demonstrado em um teste comparativo *in vivo* tal como um estudo de primata não humano (NHP) do Exemplo 5 onde NHPs são tratados com PPMO#1 ou PMO#1 e salto de éxon 53 é medido em vários tecidos musculares relevantes (vide o Exemplo 5 para detalhes). Ademais, devido ao fato de PPMO#1 se decompor no meio de SKM-M usado nesse exemplo (dados não mostrados) na escala de tempo desse estudo, o estudo de NHP pode demonstrar um aperfeiçoamento ainda maior que aquele demonstrado nesse exemplo.

Exemplo 4: estudo de camundongo mdx

[0359]O camundongo mdx é um modelo animal bem caracterizado e aceito para distrofia muscular de Duchene (DMD) que contém uma mutação no éxon 23 do gene de distrofina. A sequência antissenso de M23D (SEQ ID NO: 2) é conhecida por induzir o salto de éxon 23 e restaurar a expressão de distrofina funcional. Os camundongos MDX de 6 a 7 semanas de idade receberam uma injeção única na veia caudal de PPMO4225 ou PMO4225 da tabela abaixo a uma dose de 40 mg/kg, ou com solução salina.

Nome	Sequência de Alvejamento (TS)	TS ID NO.	SEQ	5'	3'
PMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	H	
PPMO4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2	EG3	-G-R <sub>6</sub>	

PMO4225 e PPMO4225 foram, cada um, preparados por Método A de PMO e métodos de conjugação de CPP descritos acima.

[0360]Os camundongos tratados foram sacrificados em 7, 30, 60 e 90 dias após a injeção de dose única (n=6 por grupo). O diafragma, coração e quadríceps direito foram processados para análise de western blot para medir a produção de proteína de distrofina e análise de RT-PCR para medir a porcentagem de salto de éxon, e o quadríceps esquerdo foi processado para imuno-histoquímica e mancha de H/E, conforme descrito acima.

[0361]A restauração de proteína de distrofina foi quantificada por western blot, e a porcentagem de salto de éxon 23 foi medida por RT-PCR, cada uma conforme descrito acima.

[0362]Os resultados de RT-PCR são e Western Blot mostrados nas Figuras 5A a 10B e nas tabelas abaixo. Surpreendentemente, PPMO4225 induziu níveis significativamente mais altos e sustentados de restauração de distrofina e salto de éxon 23 em comparação com PMO4225, com níveis mais altos que ocorrem 30 dias após a injeção. De modo ainda mais surpreendente, PPMO4225 aumentou os níveis de

distrofina no coração quando PMO4225 não aumentou; distrofina e o salto de exón não foram observados no coração em todos os pontos no tempo com PMO4225.

	Quantificação de Proteína de Distrofina como Porcentagem de Proteína de Tipo Selvagem (% de WT) por Western Blot								
	Composto	PMO4225				PPMO4225			
	Dia	7	30	60	90	7	30	60	90
<u>Tecido</u>									
Quadríceps		1,1	2,3	1,6	0,7	20,7	28,1	20,8	8,2
Diafragma		1,4	1,9	1,3	0,6	14,5	15,2	9,8	2,3
Coração		0	0	0	0	2,0	1,0	0,9	0,1

	Porcentagem de Salto de Exón conforme Medido por RT-PCR								
	Composto	PMO4225				PPMO4225			
	Dia	7	30	60	90	7	30	60	90
<u>Tecido</u>									
Quadríceps		21,2	5,5	7,9	2,8	61,5	42,02	28,8	6,9
Diafragma		29,9	2,6	0,5	0	51,6	36,76	3,05	0
Coração		0	0	0	0	13,15	2,64	0	0

[0363]Os resultados de imuno-histoquímica são mostrados na Figura 11. Aqui, PPMO4225 restaura distrofina pelo quadríceps, enquanto 4225 produz um padrão ‘semelhante a emplastro’ de expressão. A distribuição uniforme de distrofina com tratamento de PPMO4225 indica que o alvejamento disseminado de músculo esquelético é alcançável. PPMO4225 melhorou de modo significativo a administração por PMO4225 *in vivo*.

#### Exemplo 5: salto de exón 53 em nhp

[0364]Para demonstrar adicionalmente a eficácia de salto de exón de oligômeros antissenso de PPMO, os primatas não humanos são utilizados. Especificamente, macacos cinomolgos que têm tecidos de músculo intacto são injetados de modo intravenoso, com PPMO nº 1, PMO nº 1 (a partir do Exemplo 3), ou solução salina de acordo com a programação de dosagem na tabela abaixo:

### Programação de dosagem de cinomolgo

Grupo	Composto	Dose (mg/kg )	Nú- mero por grupo	Estratégia de Administração
1	PPMO nº 1	20	3	
2	PPMO nº 1	40	3	
3	PPMO nº 1	80	3	
4	PPMO nº 1	160	3	
5	PMO nº 1	40	3	
6	Soro fisiológico	0	2	
7	PPMO nº 1	40	2	 <p>Dosagem uma vez por semana, 4 doses totais</p> <p>Os animais foram sacrificados 48 horas após a última dose, no dia 22</p>
8	PPMO nº 1	40	2	 <p>Dose única no dia 1 com recuperação de 4 semanas</p>  <p>Dose única no dia 1 com recuperação de 8 semanas</p>

[0365]Os animais serão observados no decorrer do estudo, incluindo observações clínicas (por exemplo, avaliação de pele e pelo, efeitos respiratórios) e medições de peso corporal. Amostras de sangue e urina serão colhidas pelo menos antes do início dos testes, e 24 horas após a primeira dose e a última dose (onde aplicável).

[0366]Em cada necrópsia programada, ou submetida à eutanásia *in extremis*, as seções de diafragma, músculo liso do duodeno, esôfago e aorta, quadríceps, deltóide, bíceps, e coração são coletados e congelados rapidamente. A porcentagem de salto de éxon 51 é determinada com o uso de RT-PCR conforme descrito acima.

Exemplo 6: estudo de resposta de dose de camundongo mdx

[0367]Os camundongos MDX de 6 a 7 semanas de idade receberam uma injeção única na veia caudal de PPMO4225 ou PMO4225 descrito acima a uma dose de 40 mg/kg, 80 mg/kg, ou 120 mg/kg (n=6 por grupo).

[0368]Os camundongos tratados foram sacrificados em 30 dias após a injeção. O diafragma, quadríceps, e coração foram processados para análise de western blot para medir a produção de proteína de distrofina com base no protocolo de western blot descrito acima (usado, por exemplo, no Exemplo 4) com as modificações a seguir:

Parâmetro	Protocolo de Western Blot do Exemplo 4	Modificações de Protocolo de Western Blot
Quantificação de Proteína	Kit de Ensaio de Proteína de RC DC	Método de BCA
Etapa de Bloqueio	De um dia para o outro a 4 °C	1 Hora à RT
Incubação de Anticorpo Primário	1 hora à RT	De um dia para o outro a 4 °C
Concentração de Anticorpo Primária	1:20	1:500

[0369]A restauração de proteína de distrofina como % de tipo selvagem é apresentada na tabela abaixo e nas Figuras 12 a 15.

	Quantificação de Proteína de Distrofina como Porcentagem de Proteína de Tipo Selvagem (% de WT) por Western Blot						
	Composto	PMO4225			PPMO4225		
	Dose (mg/kg)	40	80	120	40	80	120
<u>Tecido</u>							
Diafragma	0,80	0,97	1,83	8,02	26,03	42,77	
Coração	0,13	0,24	0,34	0,61	6,34	19,48	
Quadríceps	3,5	2,6	3,0	43	90	144	

[0370]De modo surpreendente, os dados mostram que uma dose única de PPMO4225 aumenta os níveis de distrofina de maneira dependente de dose em camundongos mdx para uma extensão significativa e substancialmente maior do que PMO4225.

#### Exemplo 7: estudo de ihc de camundongo mdx de diafragma e coração

[0371] Os camundongos MDX com 6 a 7 semanas de idade receberam uma injeção única na veia caudal de PPMO4225 em uma dose de 80 mg/kg ou solução salina, e camundongos de tipo selvagem com 6 a 7 semanas de idade receberam uma injeção única de solução salina. Os camundongos mdx tratados, camundongos mdx com solução salina, e camundongos do tipo selvagem foram sacrificados em 30 dias após a injeção de dose única (n=4 por grupo). Os resultados de imuno-histoquímica são mostrados na Figura 19. Aqui, os resultados mostram aumento uniforme em distrofina em tecidos associados à morbidez e mortalidade em DMD em camundongos mdx tratados com PPMO4225.

Exemplo 8: salto de éxon 53 *in vitro* (miotubos)

[0372] Dois compostos que alvejam éxon 53 de distrofina humana (*DMD*), conforme descrito na tabela abaixo, PMO nº 1 e PPMO nº 1, ambos os quais contêm a mesma sequência, foram avaliados para salto de éxon 53 de *DMD* em miotubos humanos saudáveis.

Sequências de pmo nº 1 e ppmo nº 1 para éxon 53 de *dmd* humano.

Nome	Sequência de composto	Sequência de alvejamento ID NO.	5'	3'
PMO#1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C	H53(+36+60)	EG3	H
PPMO#1	GTT GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT C	H53(+36+60 R6G)	EG3	GR6Ac

[0373] Especificamente, mioblastos humanos saudáveis (passagens 5 a 6, SKB-F-SL adquirido a partir de Zen-Bio, Inc.) foram culturados para alcançar 80 a 90% de confluência em meio SKM-M antes da iniciação da diferenciação incubando-se em meio sérico baixo (SKM-D, Zen-Bio, Inc.) Cinco dias após a diferenciação, miotubos maduros foram incubados com os compostos anteriores em várias concentrações (isto é, 40 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2,5 µm, e 1,25 µm). Após noventa e seis horas de

incubação, os miotubos foram lavados com PBS e lisados por tampão de lise de RLT do kit RNeasy Micro (nº de cat. 7404, Qiagen). O total de RNA foi isolado de acordo com a recomendação do fabricante, exceto por 20µL de água livre de RNase terem sido usados para eluir RNA.

[0374]Para determinar o salto de éxon 53 por ambos os compostos, RT-PCR de ponto final de duas etapas foi realizada. Especificamente, sete microlitros de RNA total foram primeiro transcritos de modo reverso a cDNA pelo kit de síntese SuperScript IV First-strand (nº de cat. 18091200, Invitrogen) com o uso de hexâmeros aleatórios, de acordo com as instruções do fabricante. PCR foi realizada adicionando-se 5 µL de cDNA em Platinum Taq DNA polymerase PCR Supermix High Fidelity (nº de Cat. 12532024, Invitrogen) com iniciadores que alvejaram a junção de éxons 51/52 e 54 de *DMD* humana (iniciador direto: CAT CAA GCA GAA GGC AAC AA; iniciador reverso: GAA GTT TCA GGG CCA AGT CA). A amplificação de PCR foi realizada com o uso de termociclador em tempo real BioRad CFX96 com o uso do programa mostrado na Tabela 2. A expressão dos produtos de PCR saltados ou não saltados foi avaliada carregando-se 32 µL de produto de PCR no sistema LabChip GX com o uso de kit de Reagente de Alta Sensibilidade de DNA (CLS760672, Perkin Elmer). A porcentagem de salto de éxon 53 de DMD é calculada como a porcentagem da molaridade (nmol/l) para a banda saltada de éxon 53 (201bp) em comparação com a molaridade de soma para as bandas saltadas (201 bp) e as não saltadas (413 bp).

[0375]O teste t de Student de duas caudas (homoscedástico) foi usado para avaliar a possibilidade dos meios dos 2 grupos serem estatisticamente diferentes um do outro em cada dose. O valor  $P < 0,05$  foi considerado como estatisticamente significante.

[0376]Programa termociclador usado para amplificar amplicons de *DMD* com ou sem o salto de éxon 53.

Etapa	Temperatura	Tempo
8. Desnaturar	94 °C	2 min
9. Desnaturar	94 °C	30 s
10. Anelamento	61,2 °C	30 s
11. Estender	68 °C	1 min
12. Repetir etapas 2 a 4	34 ciclos	
13. Extensão Final	68 °C	5 min
14. Armazenar	4 °C	∞

[0377]Os resultados são apresentados na tabela abaixo e na Figura 20. Na Figura 20, barras de erros apresentam média ± SD, “[Número] x” denota uma alteração de vezes relativa em porcentagem de salto de éxon por PPMO#1 comparado a PMO#1 em cada concentração, e “\*,” “\*\*” indicam uma diferença significativa entre PMO#1 e PPMO#1 com p-valor < 0,05 ou 0,005, respectivamente.

Porcentagem de salto de éxon 53 DE DMD por pmo nº 1 E ppmo nº 1 EM MIOTUBOS HUMANOS.

Composto/ Dose (μm)	Porcentagem de Salto de Éxon (média ± SD)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
PMO nº 1	1,45±0,39	2,63±0,50	3,33±0,47	4,78±0,88	8,40±0,53	12,98±1,2
PPMO nº 1	3,10±1,67	2,45±0,52	4,73±1,01	7,08±0,48	9,45±1,03	12,08±1,3

[0378]Os dados na tabela anterior e na Figura 20 mostram, surpreendentemente, que um salto de éxon 53 significativamente maior resulta em miotubos quando as células forem tratadas com PPMO#1 conforme comparado a PMO#1 pelo menos

nas concentrações de 5 µm e 10 µm, cujo grau é inesperado. Esse aperfeiçoamento significativo provavelmente será adicionalmente demonstrado em um teste comparativo *in vivo* tal como um estudo de primata não humano (NHP) do Exemplo 5 onde NHPs são tratados com PPMO#1 ou PMO#1 e salto de exón 53 é medido em vários tecidos musculares relevantes (vide o Exemplo 5 para detalhes). Ademais, devido ao fato de PPMO#1 se decompor no meio de SKM-M usado nesse exemplo (dados não mostrados) na escala de tempo desse estudo, o estudo de NHP pode demonstrar um aperfeiçoamento ainda maior que aquele demonstrado nesse exemplo.

[0379]Todas as publicações e pedidos de patente citados neste relatório descriptivo estão incorporados ao presente documento a título de referência como se cada publicação ou pedido de patente individual estivesse específica e individualmente indicado como incorporado a título de referência.

#### Referências

[0380]Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multixon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense." Am J Hum Genet 74(1): 83-92.

[0381]Abes, R., et al. (2008). "Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides." J Pept. Sci. 14: 455-460.

[0382]Alter, J., et al. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." Nat. Med. 12(2): 175-177.

[0383]Bestas, B., et al. (2014). "Splice-correcting ligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model." J. Clin. Invest.

[0384]Cirak, S., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phos-

phorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." Lancet 378(9791): 595-605.

[0385]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.

[0386]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.

[0387]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.

[0388]Goemans, N. M., M. Tulinius, et al. (2011). "Systemic Administration of PRO051 in Duchenne's Muscular Dystrophy." N Engl J Med.

[0389]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.

[0390]Jearawiriyapaisarn, N., et al. (2010). "Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers." Cardiovascular Research 85: 444-453.

[0391]Kinali, M., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study." Lancet Neurol 8(10): 918-28.

[0392]Leblue, B., et al. (2008). "Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides." Adv. Drug Deliv. Rev. 60: 517-529.

[0393]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.

[0394]Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy." Gene Med 4(6): 644-54.

[0395]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.

[0396]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.

[0397]McClory, G., et al. (2006). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD." Gene Therapy 13: 1373-1381.

[0398]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.

[0399]Moulton, H.M., (2007). "Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication *in vivo*." Biochem. Society Trans 35(4): 826-828.

[0400]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.

[0401]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

[0402]Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic

human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 12840-4.

[0403]Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3): 187-95.

[0404]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.

[0405]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.

[0406]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.

[0407]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.

[0408]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.

[0409]Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A 105(39): 14814-9.

[0410]Wu, B., et al. (2012). "Long-term rescue of dystrophin expression and improvement in muscle pathology and function in dystrophic mdx mice by peptide-conjugated morpholino." The Am. J. Pathol. 181(2): 392-400.

[0411]Wu, P., et al. (2007) "Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity." Nucleic Acids Research 35(15): 5182-5191.

[0412]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.

[0413]Yin, H., et al. (2011). "Pip5 transduction peptides direct high efficiency oligonucleotide-mediated dystrophin exon skipping in heart and phenotypic correction in mdx mice." Mol. Ther 19(7): 1295-1303.

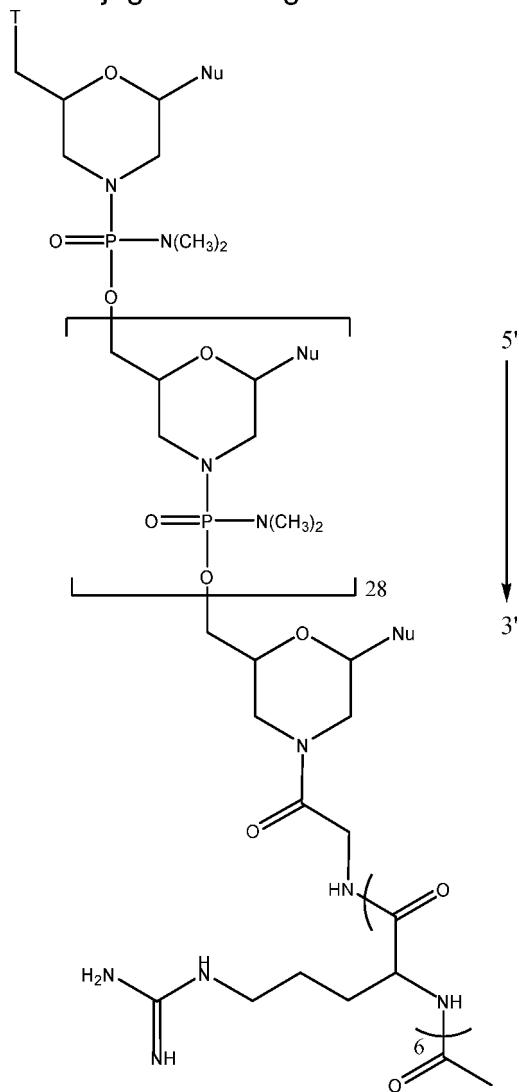
[0414]Youngblood, D., et al. (2006). "Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells." Am. Chem. Soc.

#### Listagem de sequências

Descrição	Sequência 5' a 3' ou N-terminal a C-terminal	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTC	1
mdx4225	GGCCAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R <sub>6</sub>	RRRRRR	3
R <sub>6</sub> -G	RRRRRRRG	4
Iniciador direto de ligação de junção de exón 51/52 e 54 humano	CATCAAGCAGAAGGCAACAA	5
Iniciador inverso de ligação de junção de exón 51/52 e 54 humano	GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	6
Iniciador direto de ligação de exón 23 de camundongo	CACATCTTGATGGTGTGAGG	7
Iniciador inverso de ligação de exón 23 de camundongo	CAACTTCAGCCATCCATTCTG	8

## REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado de oligômero antisenso de Fórmula (I):

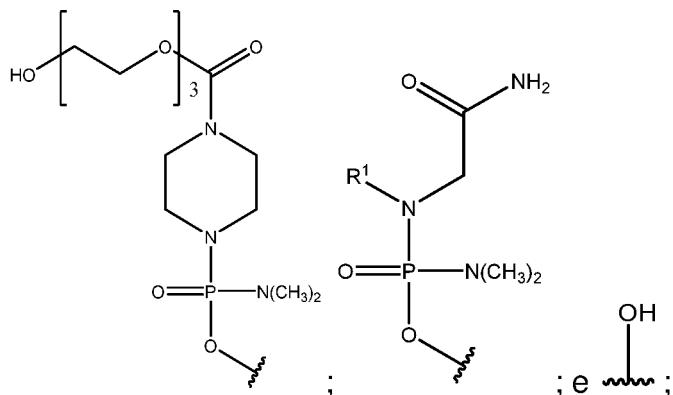


(I)

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que:

cada Nu é uma nucleobase que tomada em conjunto forma uma sequência alvo; e

T é uma porção química selecionada de:



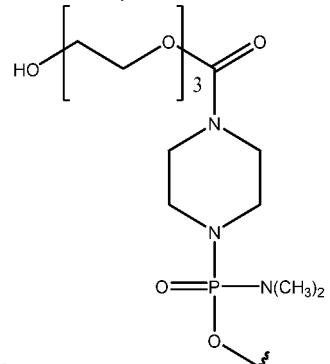
R<sup>1</sup> é C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alquila;

em que a sequência alvo é complementar a um sítio de anelamento de exon 53 no pré-mRNA de distrofina designado como H53A(+36+60).

2. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cada Nu é independentemente selecionado de citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), 5-metilcitosina (5mC), uracila (U), e hipoxantina (I).

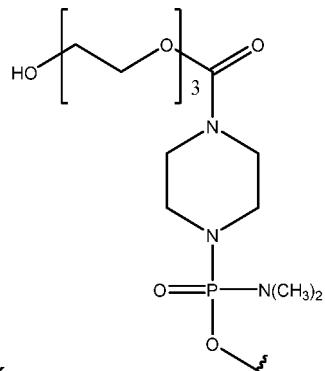
3. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência alvo é a SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT-3'), em que cada timina (T) é opcionalmente uracila (U).

4. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 1,



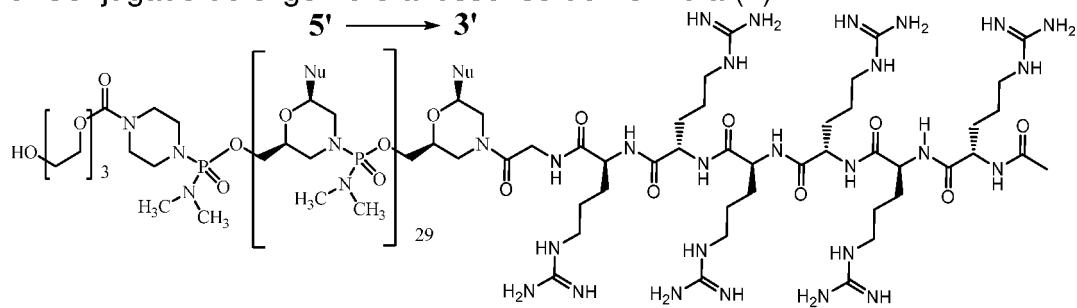
**CARACTERIZADO** pelo fato de que T é , e a sequência alvo é SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT-3'), em que cada timina (T) é opcionalmente uracila (U).

5. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 1,



**CARACTERIZADO** pelo fato de que T é , e a sequência alvo é SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTT-3').

#### 6. Conjugado de oligômero antissenso de Fórmula (II):



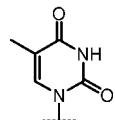
(II)

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, **CARACTERIZADO** pelo fato de que cada Nu de 1 a 25 e 5' a 3' é:

Posição No. 5' a 3'	Nu								
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C

e em que A é , C é , G é , e cada X é independentemente ou .

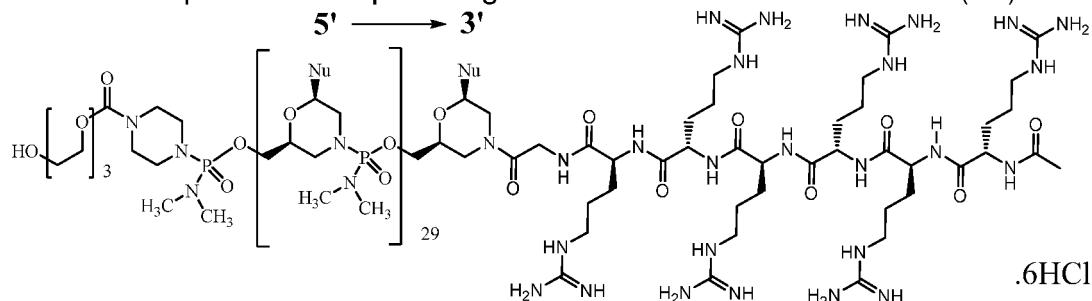
#### 7. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 6,



**CARACTERIZADO** pelo fato de que cada X é

8. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 6,

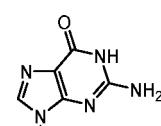
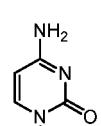
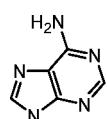
**CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligômero antissenso é de Fórmula (IIA):



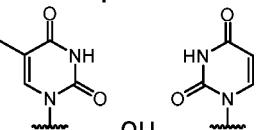
(IIA)

em que cada Nu de 1 a 25 e 5' a 3' é:

Posição No. 5' a 3'	Nu								
1	G	6	C	11	G	16	G	21	X
2	X	7	X	12	X	17	A	22	G
3	X	8	C	13	X	18	A	23	X
4	G	9	C	14	C	19	G	24	X
5	C	10	G	15	X	20	G	25	C



e em que A é



, C é



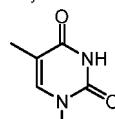
, G é



mente

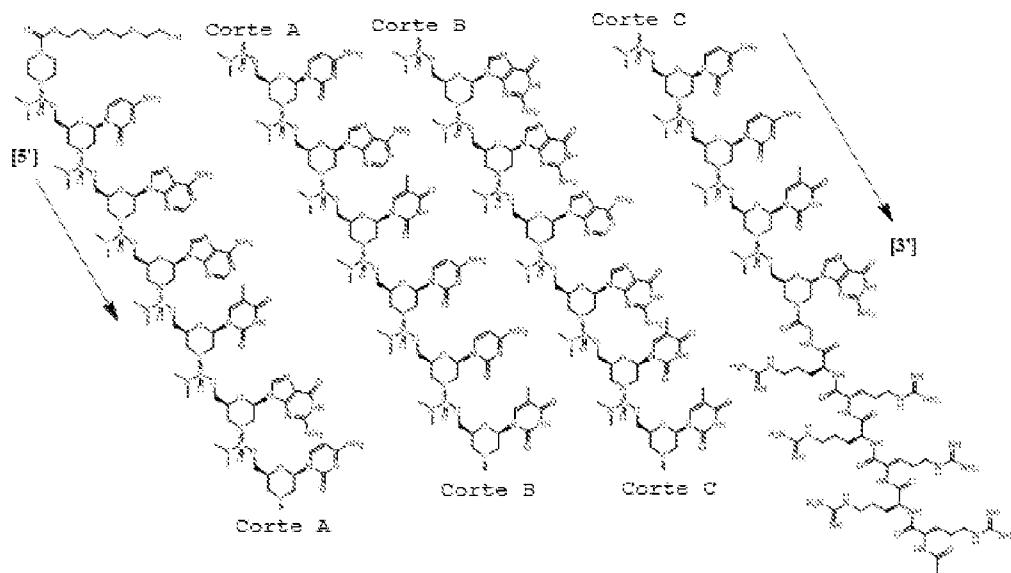
ou

9. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 8,



**CARACTERIZADO** pelo fato de que cada X é

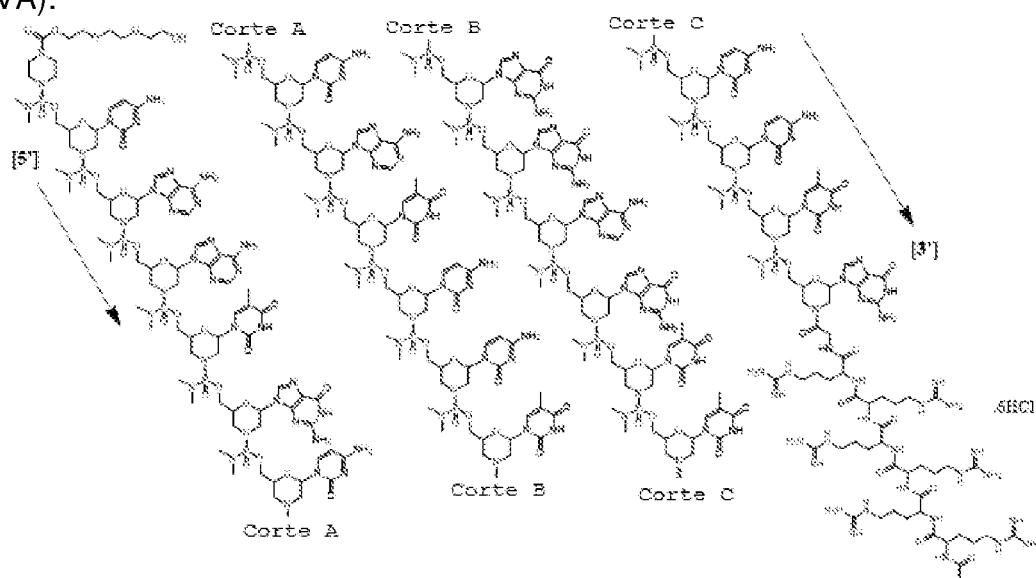
10. Conjugado de oligômero antissenso **CARACTERIZADO** pelo fato de que é da Fórmula (IV):



(IV)

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

11. Conjugado de oligômero antissenso, de acordo com a reivindicação 9, sendo que o oligômero antissenso é **CARACTERIZADO** pelo fato de que é de Fórmula (IVA):



(IVA).

12. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um conjugado de oligômero antissenso conforme definido em qualquer uma das

reivindicações 1 a 11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e um carreador farmaceuticamente aceitável.

13. Método para tratar distrofia muscular de Duchenne (DMD) em um indivíduo que necessita do mesmo em que o indivíduo tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de exon 53, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o conjugado de oligômero antissenso conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado semanalmente.

15. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado duas vezes por semana.

16. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado uma vez a cada três semanas.

17. Método, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado mensalmente.

18. Método para restaurar um quadro de leitura de mRNA para induzir a produção de distrofina em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de exon 53, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo o conjugado de oligômero antissenso conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado semanalmente.

20. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado duas vezes por semana.

21. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato

de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado uma vez a cada três semanas.

22. Método, de acordo com a reivindicação 18, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado mensalmente.

23. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado em uma dose de cerca de 30 mg/kg.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado em uma dose de cerca de 40 mg/kg.

25. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado em uma dose de cerca de 60 mg/kg.

26. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado em uma dose de cerca de 80 mg/kg.

27. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o conjugado de oligômero antissenso é administrado em uma dose de cerca de 160 mg/kg.

28. Método para tratar distrofia muscular de Duchenne (DMD) em um indivíduo que necessita do mesmo em que o indivíduo tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo a composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 12.

29. Método para restaurar um quadro de leitura de mRNA para induzir produção de distrofina em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de

que compreende administrar ao indivíduo a composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 12.

30. Método para excluir o éxon 53 de pré-mRNA de distrofina durante o processamento de mRNA em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo a composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 12.

31. Método para ligar o éxon 53 de pré-mRNA de distrofina em um indivíduo que tem uma mutação do gene de distrofina que é passível a salto de éxon 53, sendo que o método é **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende administrar ao indivíduo a composição farmacêutica conforme definida na reivindicação 12

.

卷之三

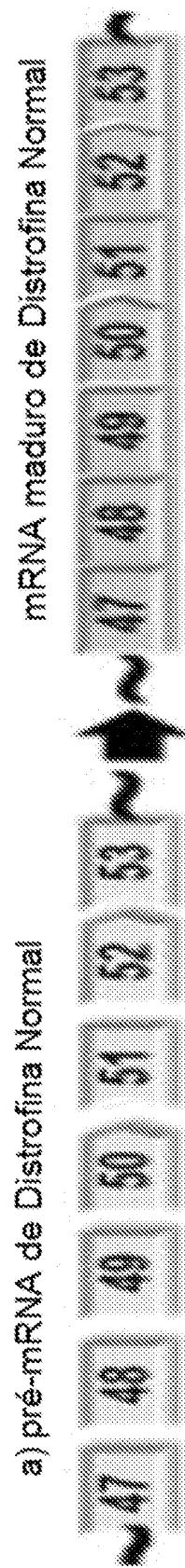


Figura 2

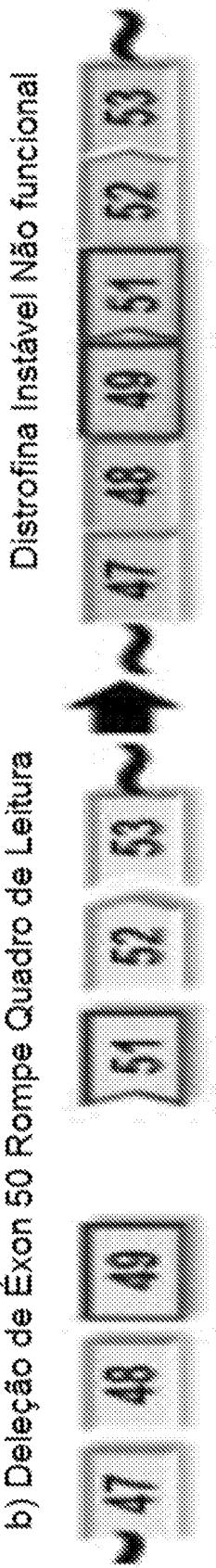
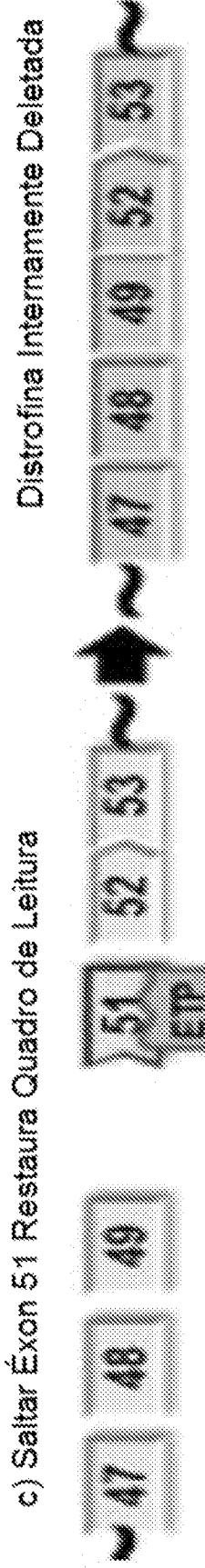


Figura 3



Fonte: Adaptada de Kole 2012

Figura 4

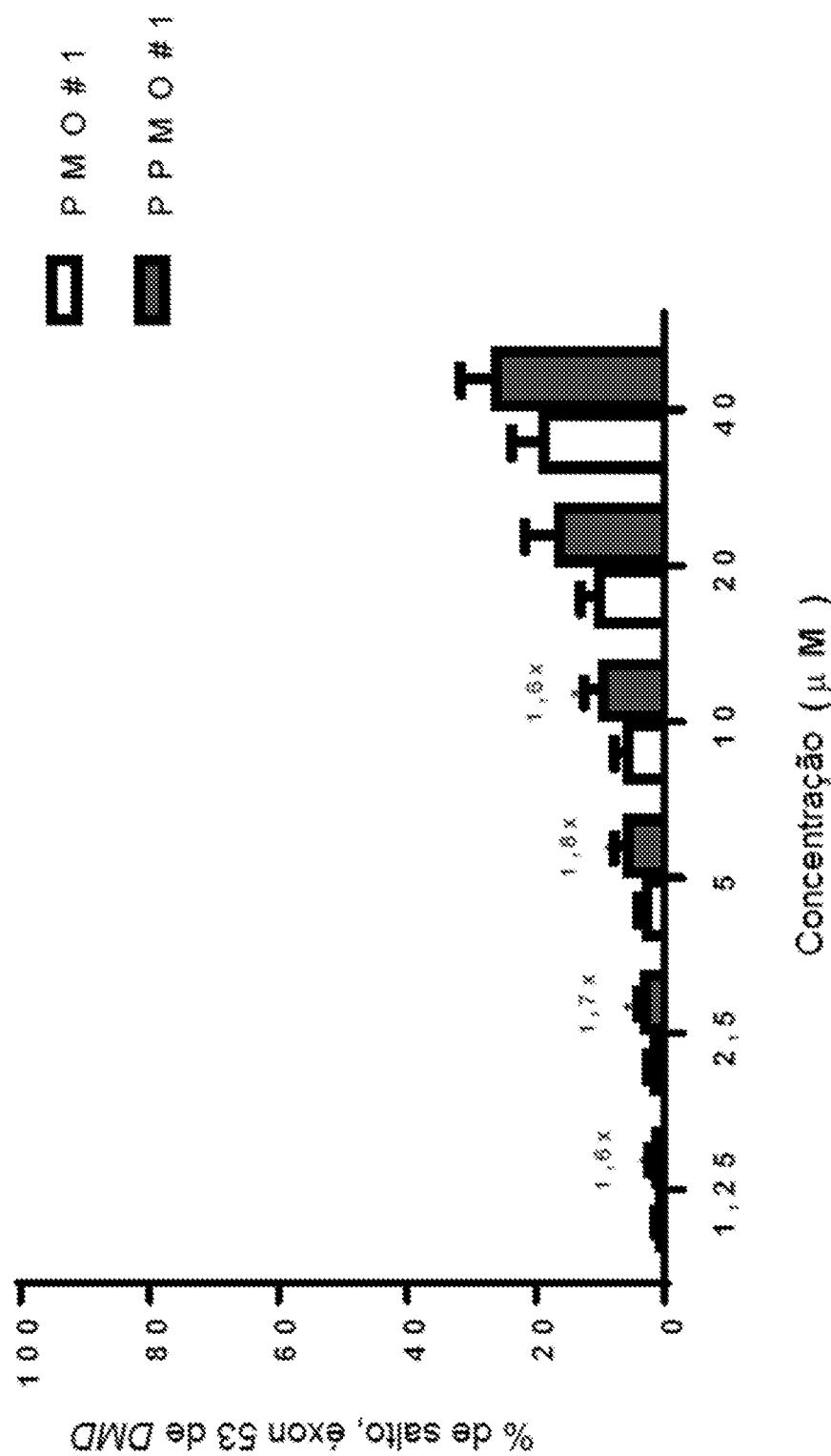
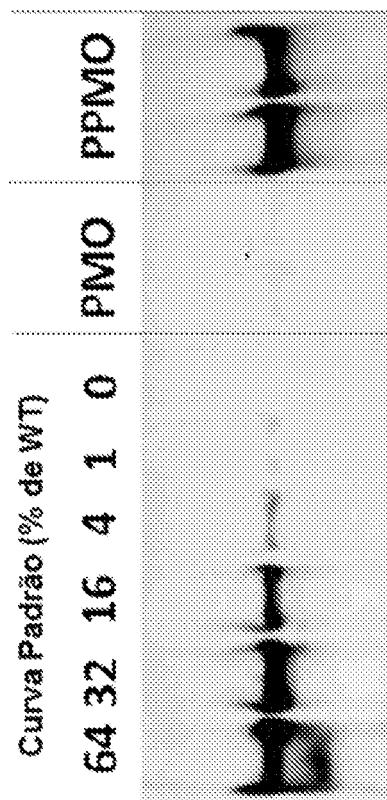
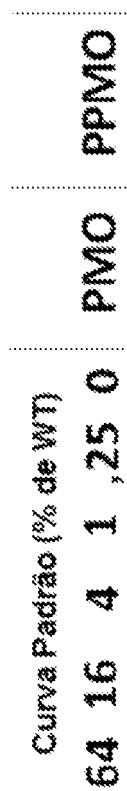


Figura 5A



58

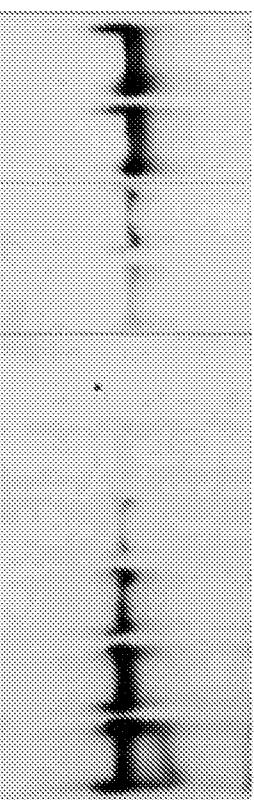
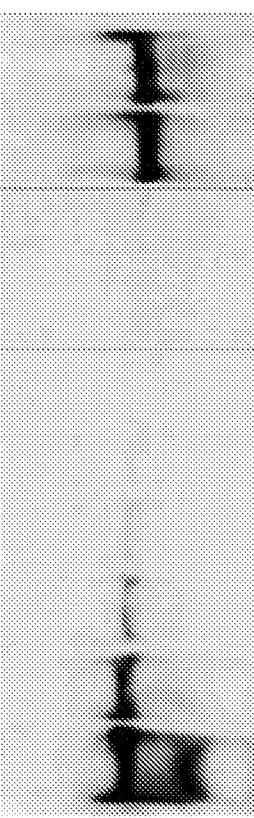
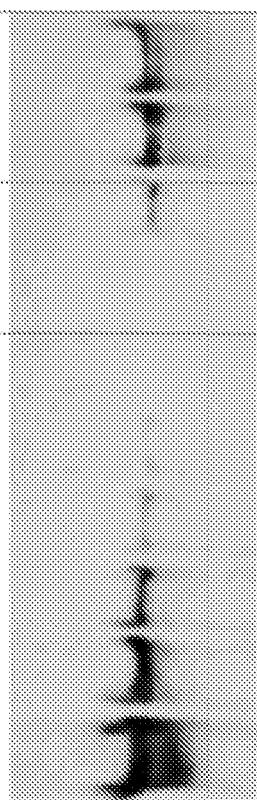
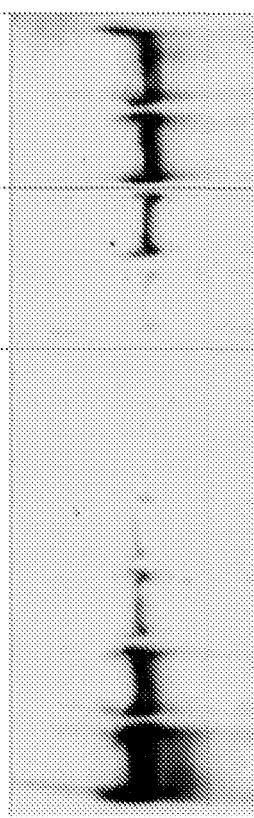


Figura 5C

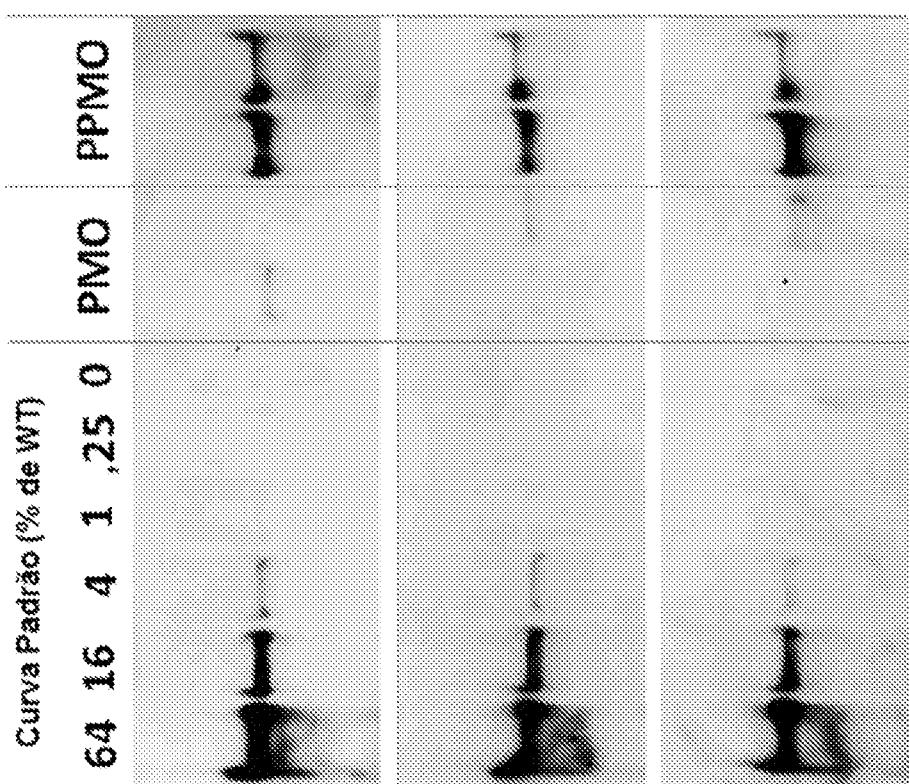
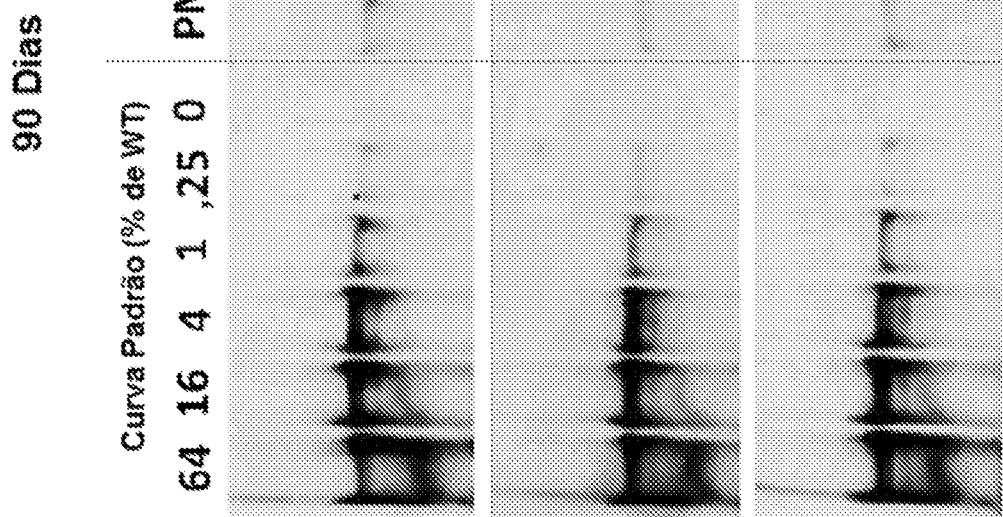


Figura 5D



60 Dias

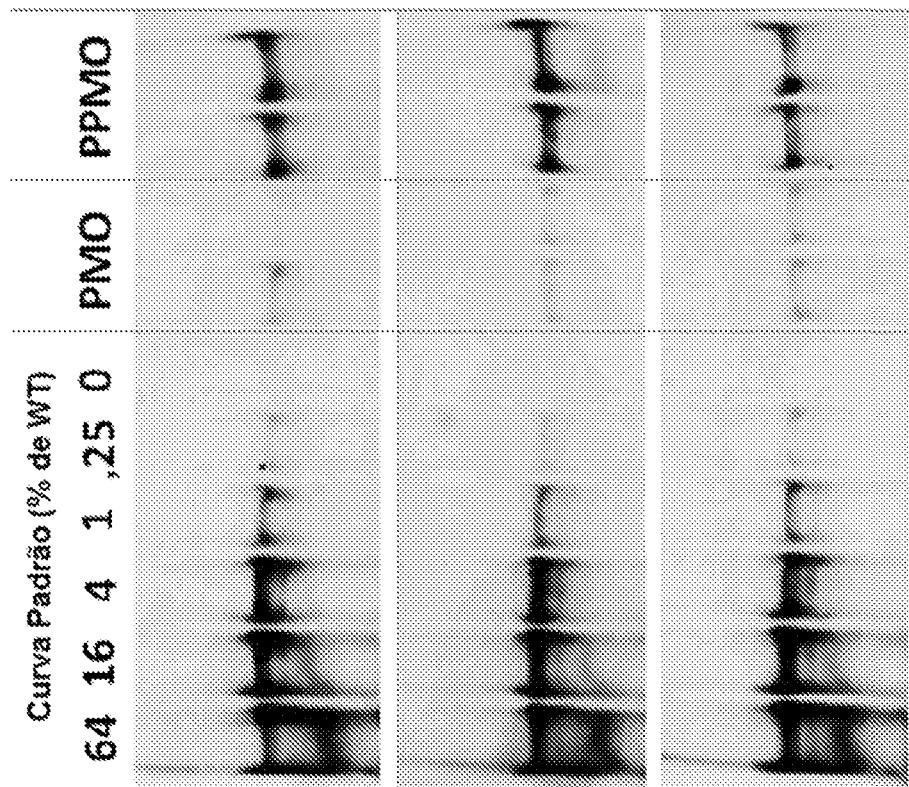
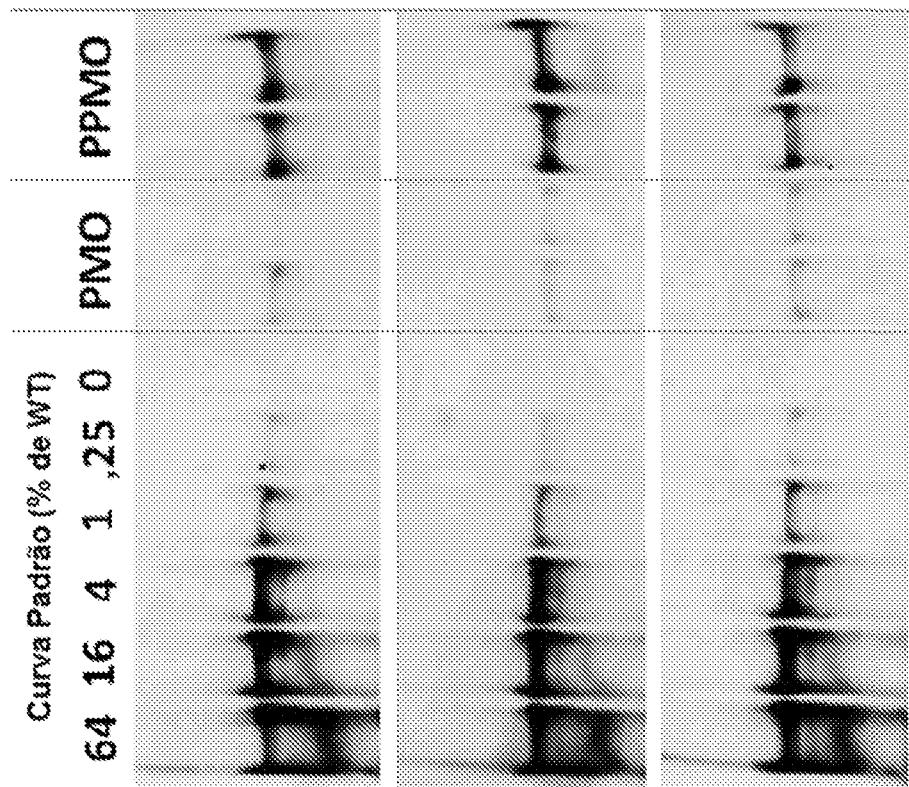


Figura 6A

## Western Blots

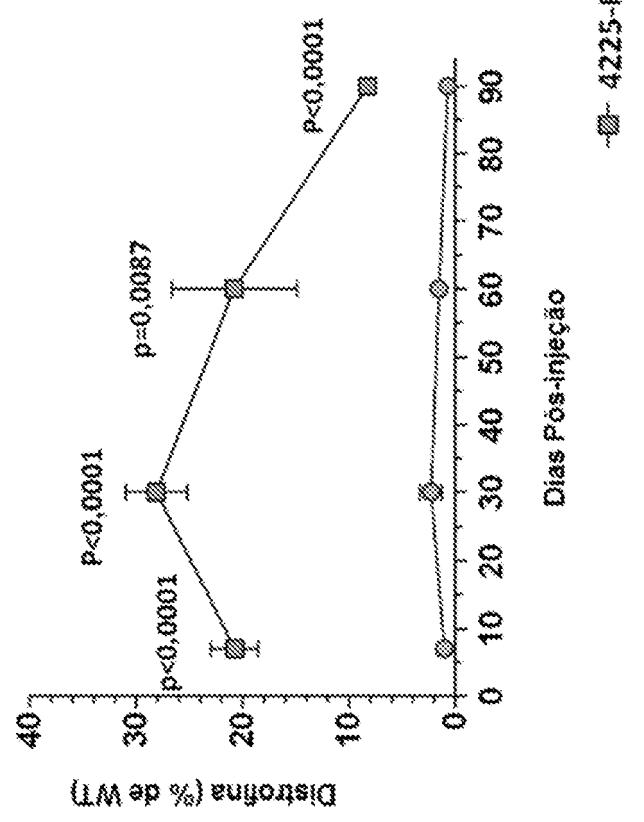


Figura 6B

## RT-PCR

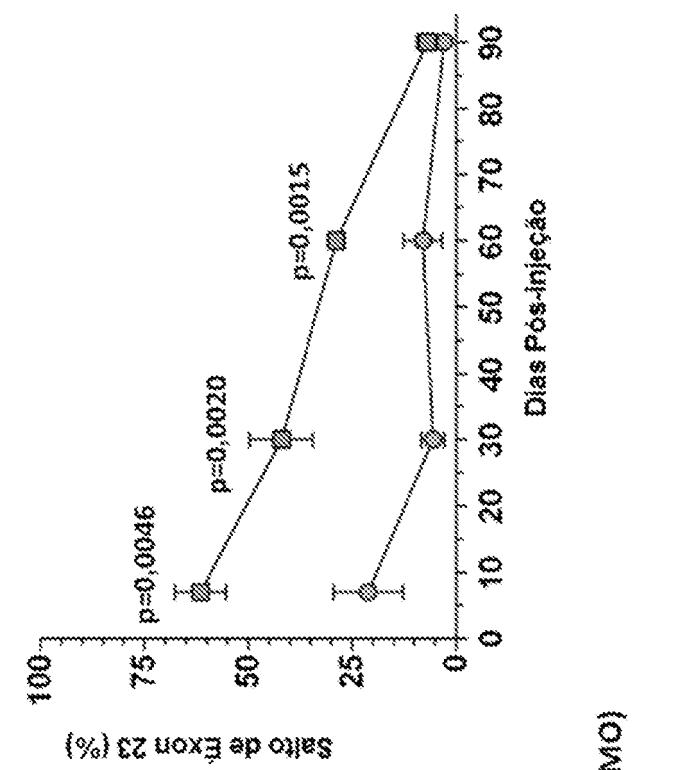


Figura 7A

7 Dias

Curva Padrão (% de WT)				ppMO
32	16	4	1	0

Figura 7B

30 Dias

Curva Padrão (% de WT)				ppMO
32	16	4	1	0

Figura 7C  
Figura 7D

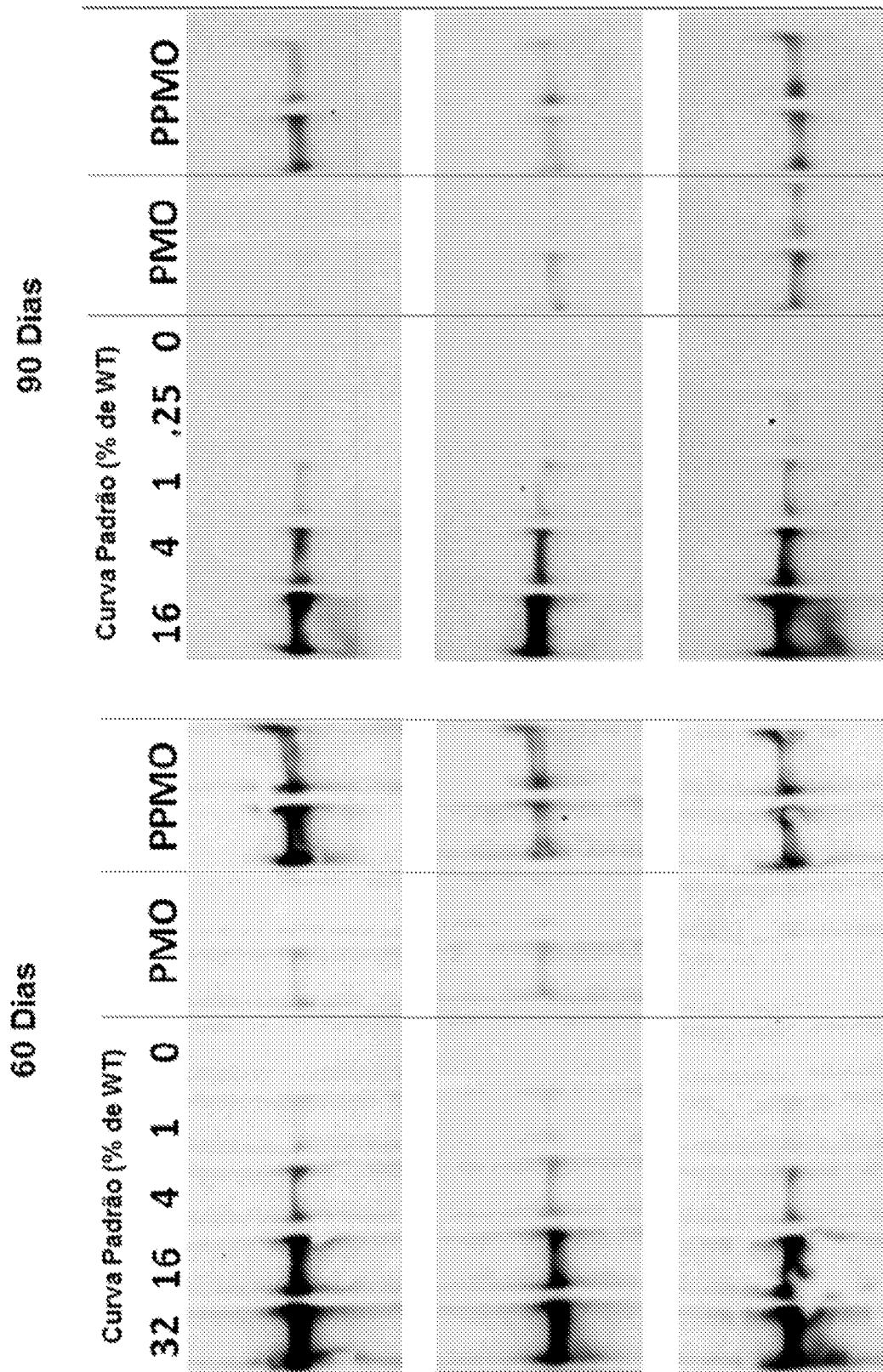


Figura 8A

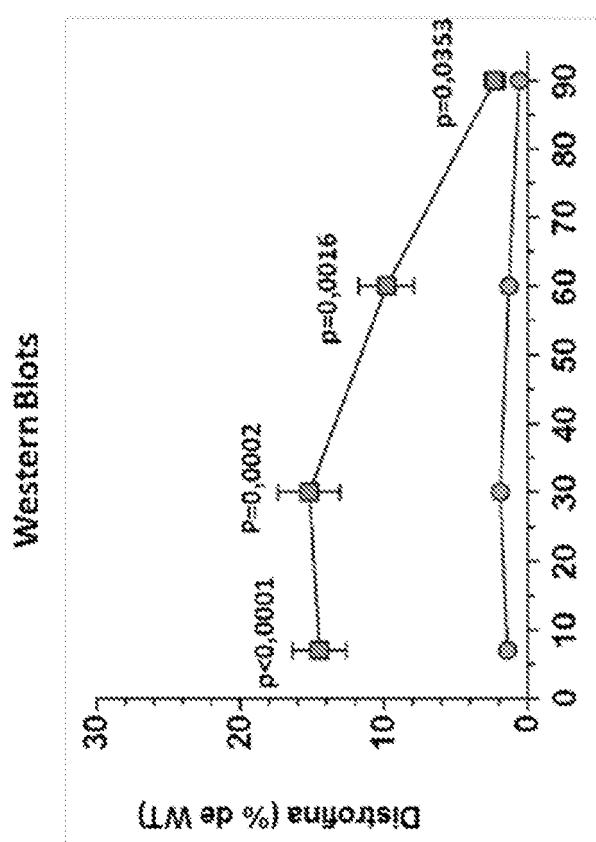


Figura 8B

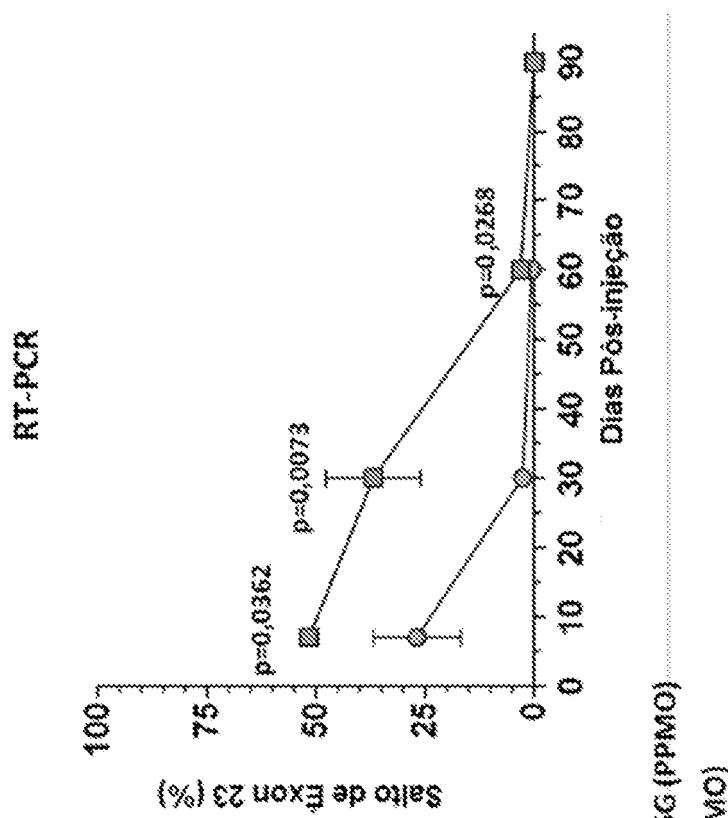


Figura 9A

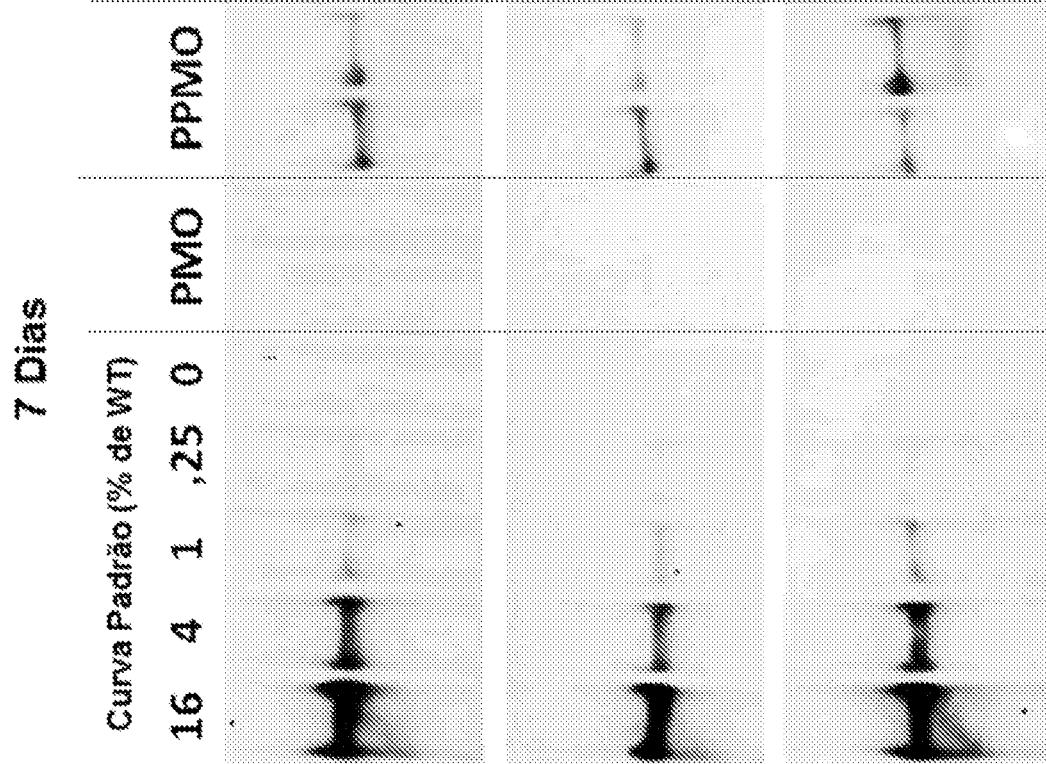


Figura 9B

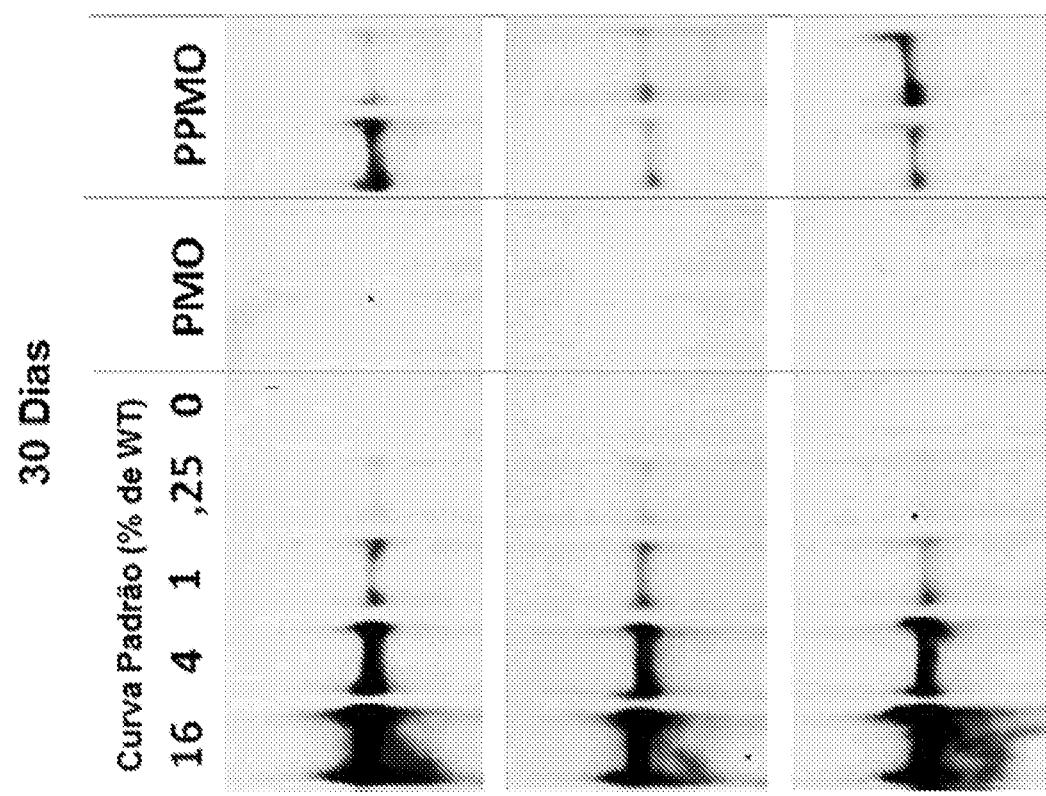


Figura 9C

60 Dias

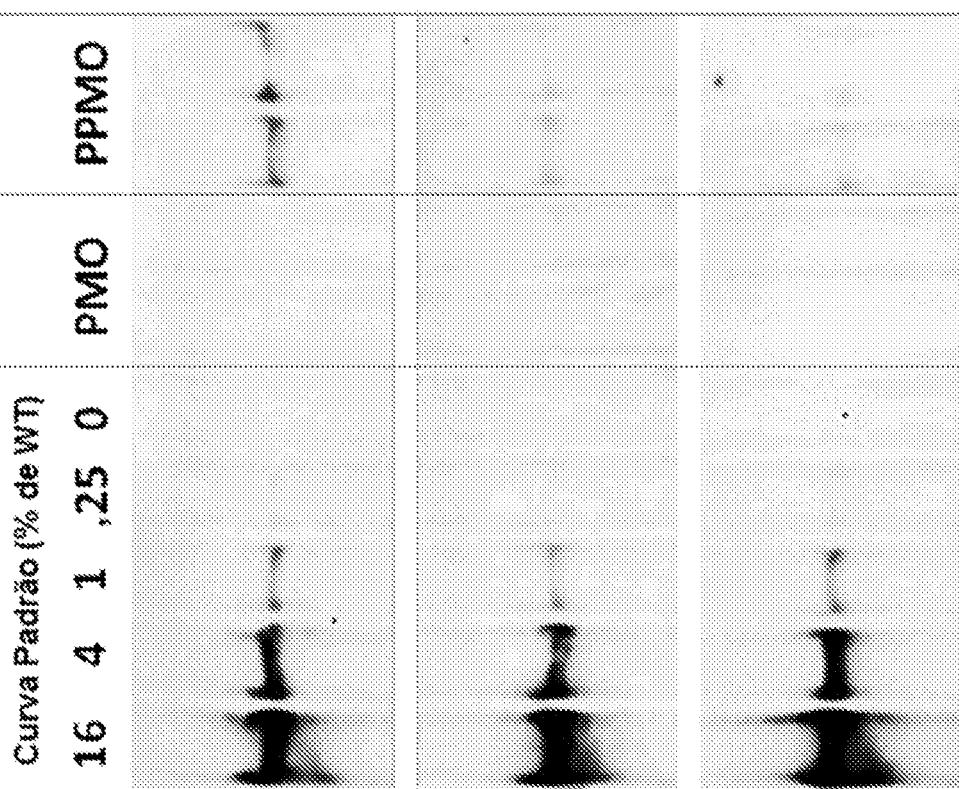


Figura 9D

90 Dias

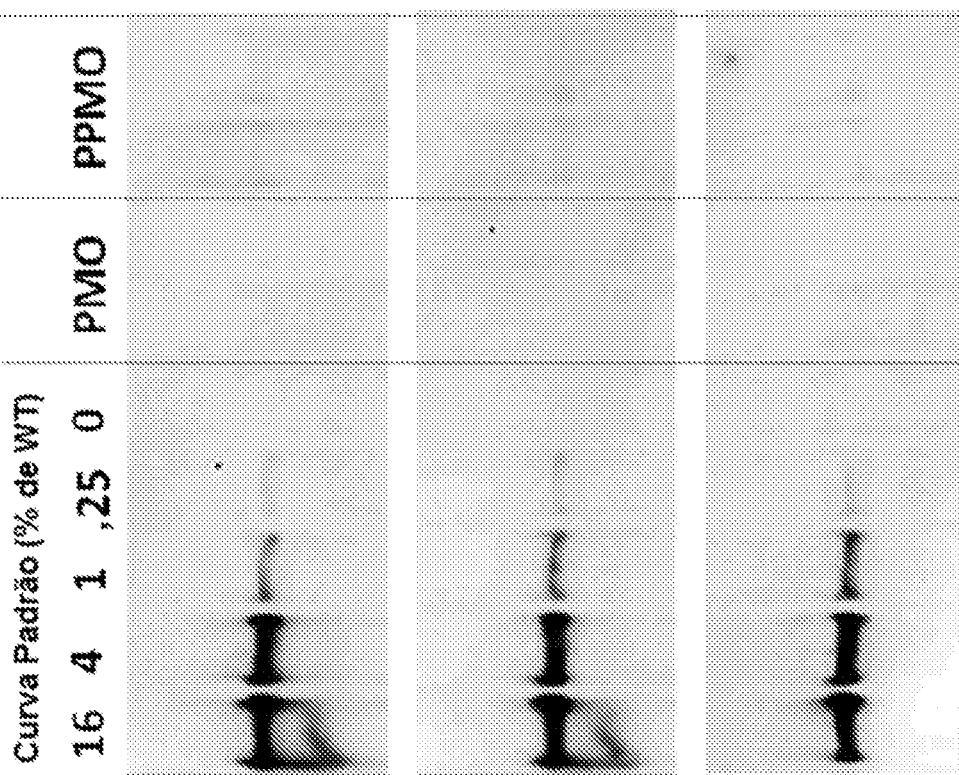


Figura 10A

## Western Blots

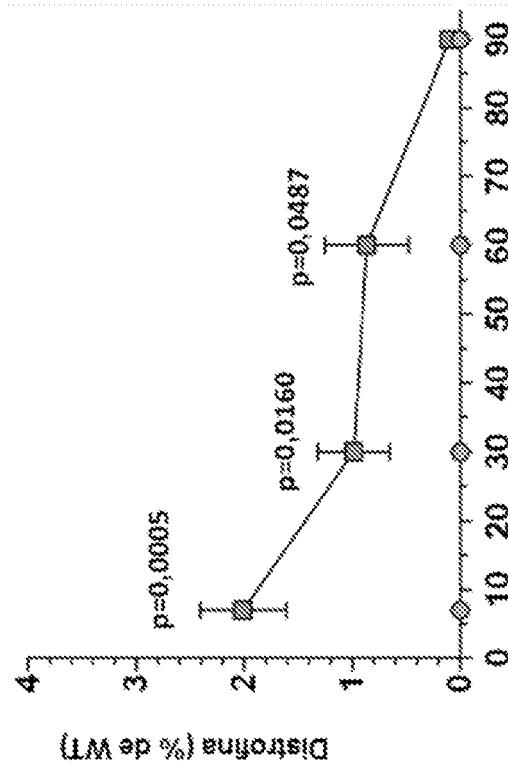


Figura 10B

## RT-PCR

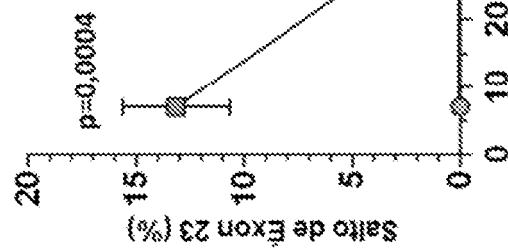


Figura 11

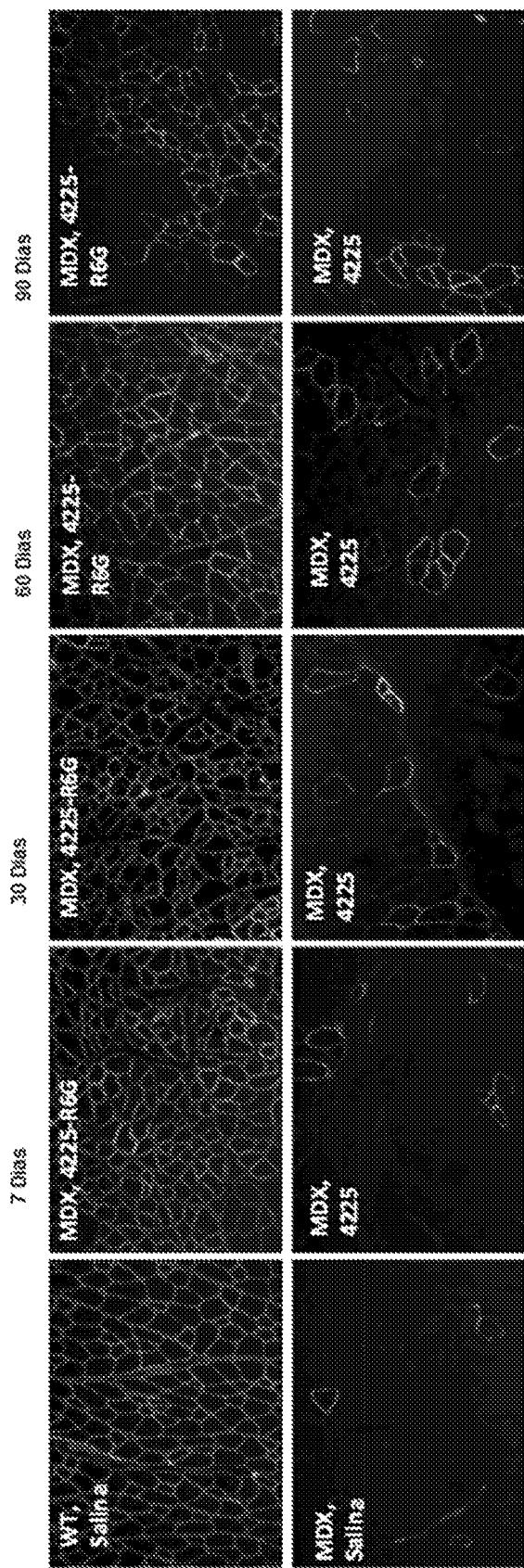


Figura 12A  
Figura 12B

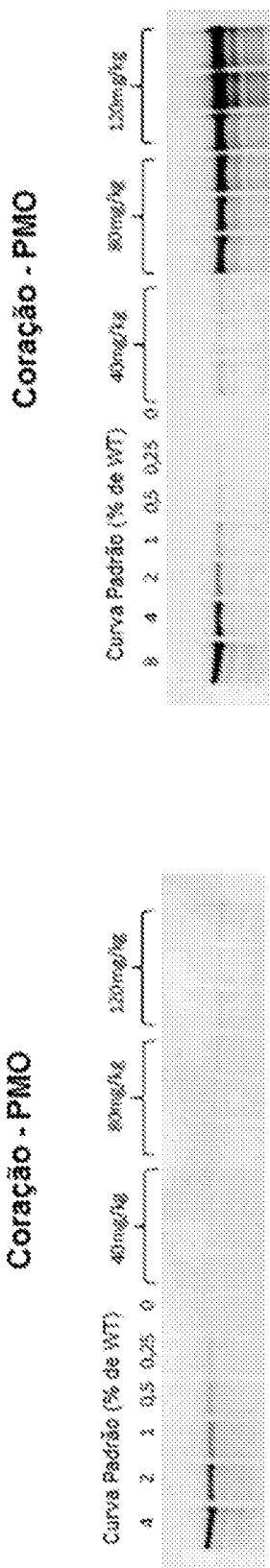


Figura 13

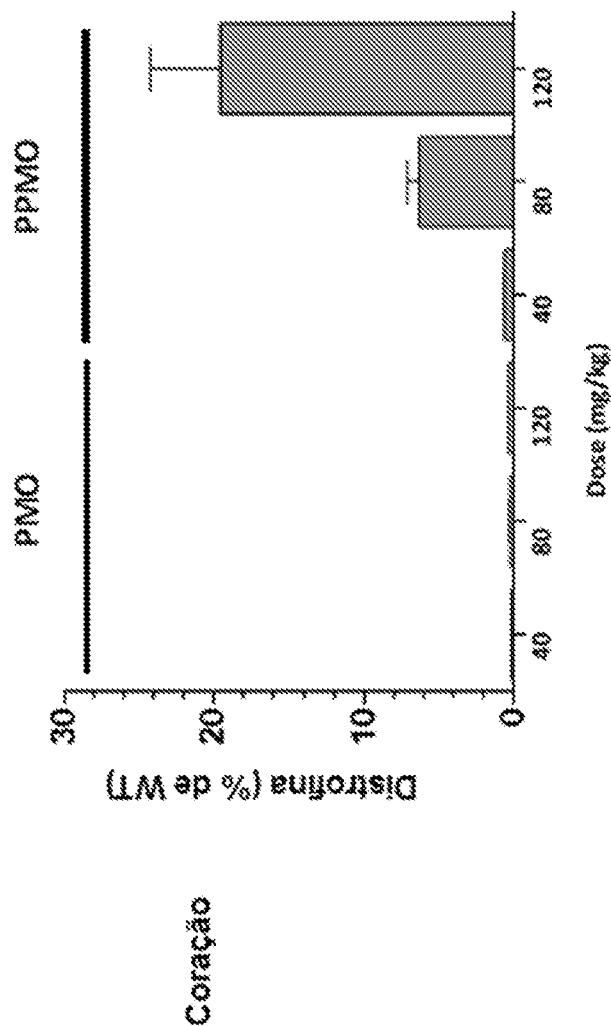


Figura 14A  
Figura 14B

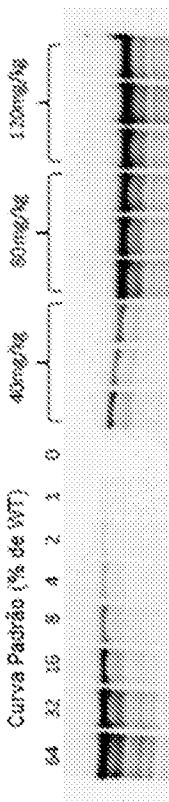
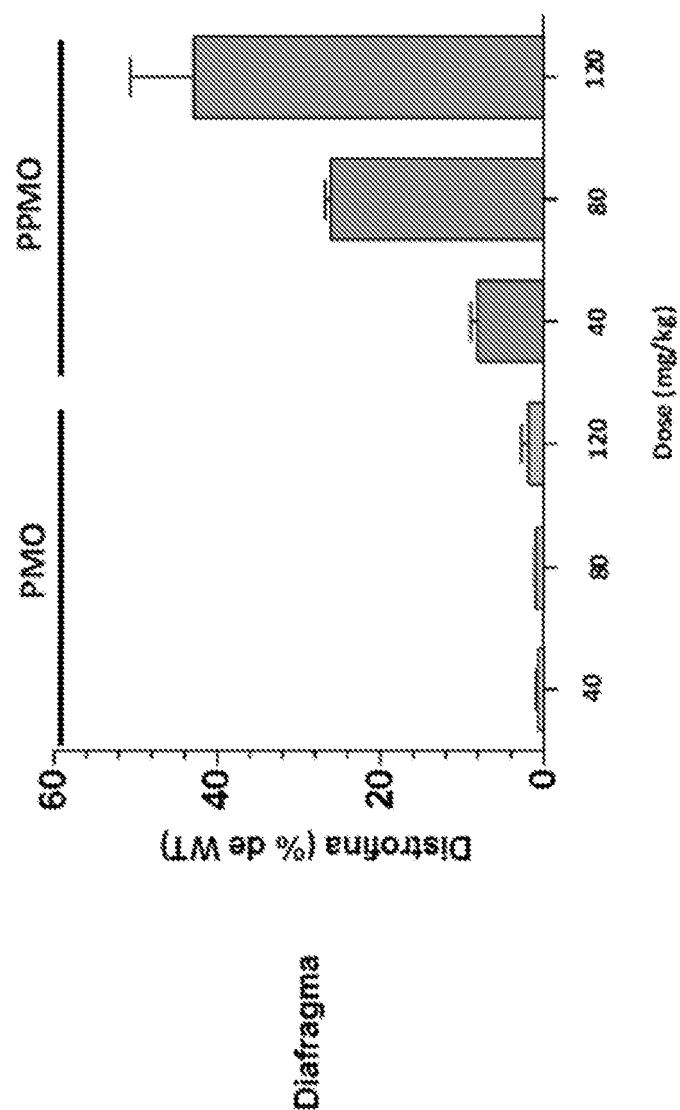


Figura 15



Diâstema

Figura 16A

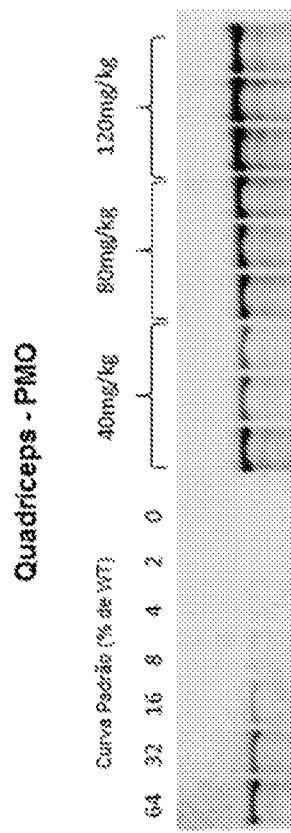


Figura 16B

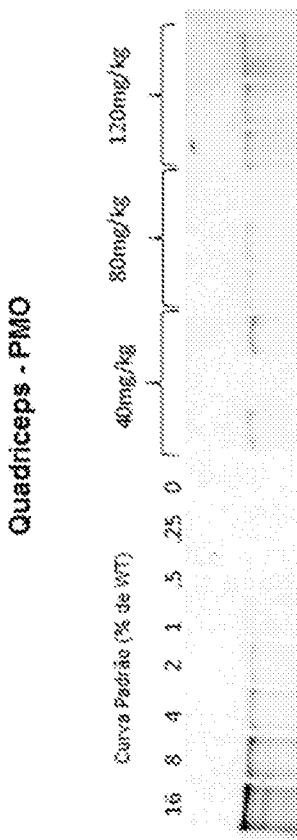
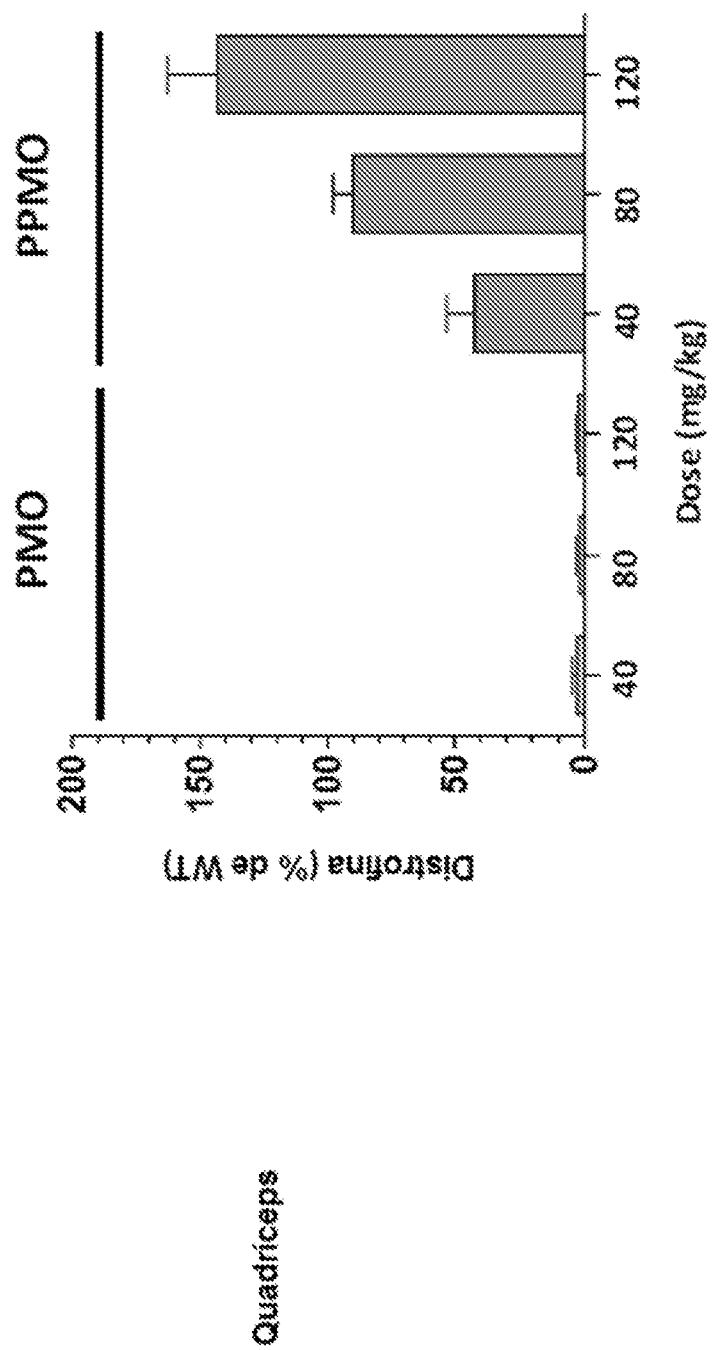


Figura 17



Nº de Ciclo Subunidade (SU)	Tratamento de Pré-acoplamento				Ciclo de Acoplamento		Tratamento de Pós-Acoplamento	
	1	2	3	4			1	2
	30% Lavagem de TFE/DCM	Solução de CYTFA <sup>1</sup>	Solução de Neutralização	Lavagem de DCM	SU de Quantidade (g) NEM (L) DMI (L)	Tempo de Acoplamento em RT (Horas)	Lavagem de DCM	30% de Lavagem de TFE/DCM
1:DPG	5,5L	a) 5,5L b) 5,5L, 122ml	3x5,5L	5,5L	536,7g; 195ml de NEM; 3,2L DMI	3	5,5L	2x5,5L
2:T	7,0L	a) 7L b) 7L, 138ml	3x7L	2x7L	468,2g e 185ml de NEM; 3,2L DMI	4,25	7L	2x7L
3:T	8L	a) 8L b) 8L, 182ml	3x8L	2x8L	536,7g; 195ml de NEM; 3,4L de DMI	4,25	8L	2x8L
4:DPG	9L	a) 9L b) 9L, 206ml	3x9L	2x9L	536,7g; 195ml de NEM; 3,6L de DMI	4,25	9L	2x9L
5:C	9,5L	a) 9,5L b) 9,5L, 220ml	3x9,5L	2x9,5L	565,2g; 195ml de NEM; 3,4L de DMI	4,25	9,5L	2x9,5L
6:C	10L	a) 10L b) 10L, 232ml	3x10L	2x10L	565,2g; 195ml de NEM; 3,45L de DMI	4,25	10L	2x10L
7:T	11L	a) 11L b) 11L, 236ml	3x11L	2x11L	536,7g; 195ml de NEM; 3,67L	4,25	11L	2x11L

Figura 18

<sup>1</sup>ml indica a quantidade de NEM/DCM 1:1

	Tratamento de Pré-acoplamento				Ciclo de Acoplamento		Tratamento de Pós-Acoplamento	
	1	2	3	4			1	2
Nº de Ciclo: Subunidade (SU)	30% Lavagem de TFE/DCM	Solução de CYTFA <sup>1</sup>	Solução de Neutralização	Lavagem de DCM	SU de Quantidade (g) NEM (L) DMI (L)	Tempo de Acoplamento em RT (Horas)	Lavagem de DCM	30% de Lavagem de TFE/DCM
					de DMI			
8.C	11L	a) 11L b) 11L, 236ml	3x11L	2x11L	566,2g; 196ml de NEM; 3,64L de DMI	4,25	11L	2x11L
9.C	11,5L	a) 11,5L b) 11,5L, 238ml	3x11,5L	2x 11,5L	468,2g; 196ml de NEM; 3,72L de DMI	4,25	11,5L	2x11,5L
10.DPG	12L	a) 12L b) 12L, 230ml	3x12L	2x12L	536,7g; 196ml de NEM; 3,96L de DMI	4,25	12L	2x12L
11.DPG	13,5L	a) 13,5L b) 13,5L, 204ml	3x13,5L	2x 13,5L	721,7g; 263ml de NEM; 4,02L de DMI	4,25	13,5L	2x13,5L
12.T	13,5L	a) 13,5L b) 13,5L, 204ml	3x13,5L	2x 13,5L	721,7g; 196ml de NEM; 4,02L de DMI	4,25	13,5L	2x13,5L
13.T	14L	a) 14L b) 14L, 216ml	3x14L	2x14L	941,9g; 263ml de NEM; 4,02L de DMI	4,25	14L	2x14L
14.C	14,5L	a) 14,5L b) 14,5L, 228ml	3x14,5L	2x 14,5L	941,9g; 263ml de NEM; 4,1L de DMI	4,25	14,5L	2x14,5L

Figura 18 (continuação)

Nº de Ciclo Subunidade (SU)	Tratamento de Pré-acoplamento				Ciclo de Acoplamento		Tratamento de Pós-Acoplamento	
	1	2	3	4			1	2
	30% Lavagem de TFE/DCM	Solução de CYTFA <sup>1</sup>	Solução de Neutralização	Lavagem de DCM	SU de Quantidade (g) NEM (L) DMI (L)	Tempo de Acoplamento em RT (Horas)	Lavagem de DCM	30% de Lavagem de TFE/DCM
15:T	15,5L	a) 15,5L b) 15,5L, 254ml	3x15,5L	2x 15,5L	721,7g; 253ml de NEM; 4,26L de DMI	4,25	15,5L	2x15,5L
16:DPG	15,5L	a) 15,5L b) 15,5L, 254ml	3x15,5L	2x 15,5L	721,7g; 253ml de NEM; 4,26L de DMI	4,25	15,5L	2x15,5L
17:A	16L	a) 16L b) 16L, 366ml	3x16L	2x16L	941,9g; 253ml de NEM; 4,4L de DMI	4,75	16L	2x16L
18:A	16,5L	a) 16,5L b) 16,5L, 378ml	3x16,5L	2x 16,5L	721,7g; 253ml de NEM; 4,4L de DMI	4,25	16,5L	2x16,5L
19: DPG	16,5L	a) 16,5L b) 16,5L, 378ml	3x16,5L	2x 16,5L	608,7g; 253ml de NEM; 4,57L de DMI	4,25	16,5L	2x16,5L
20:DPG	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	941,9g; 253ml de NEM; 4,57L de DMI	4,75	17L	2x17L
21:T	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	1168,2g; 311ml de NEM; 4,72L de DMI	4,25	17L	2x17L
22: DPG	17,5L	a) 17,5L b) 17,5L, 402ml	3x17,5L	2x 17,5L	858,7g; 311ml de NEM; 4,72L	4,75	17,5L	2x17,5L

Figura 18 (continuação)

Nº de Ciclo: Subunidade (SU)	Tratamento de Pré-acoplamento				Ciclo de Acoplamento		Tratamento de Pós-Acoplamento	
	1	2	3	4			1	2
	30% Lavagem de TFE/DCM	Solução de CYTFA <sup>1</sup>	Solução de Neutralização	Lavagem de DCM	SU de Quantidade (g) NEM (L) DMI (L)	Tempo de Acoplamento em RT (Horas)	Lavagem de DCM	30% de Lavagem de TFE/DCM
					de DMI			
23:T	17,5L	a) 17,5L b) 17,5L, 402ml	3x17,5L	2x 17,5L	889,3g; 311ml de NEM; 4,68L de DMI	4,25	17,5L	2x17,5L
24:T	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749,1g; 311ml de NEM; 4,95L de DMI	4,25	18L	2x18L
25:C	18L	a) 18L b) 18L, 414ml	3x18L	2x18L	749,1g; 311ml de NEM; 5,1L de DMI	4,25	18L	2x18L

Figura 18 (continuação)

Figura 19

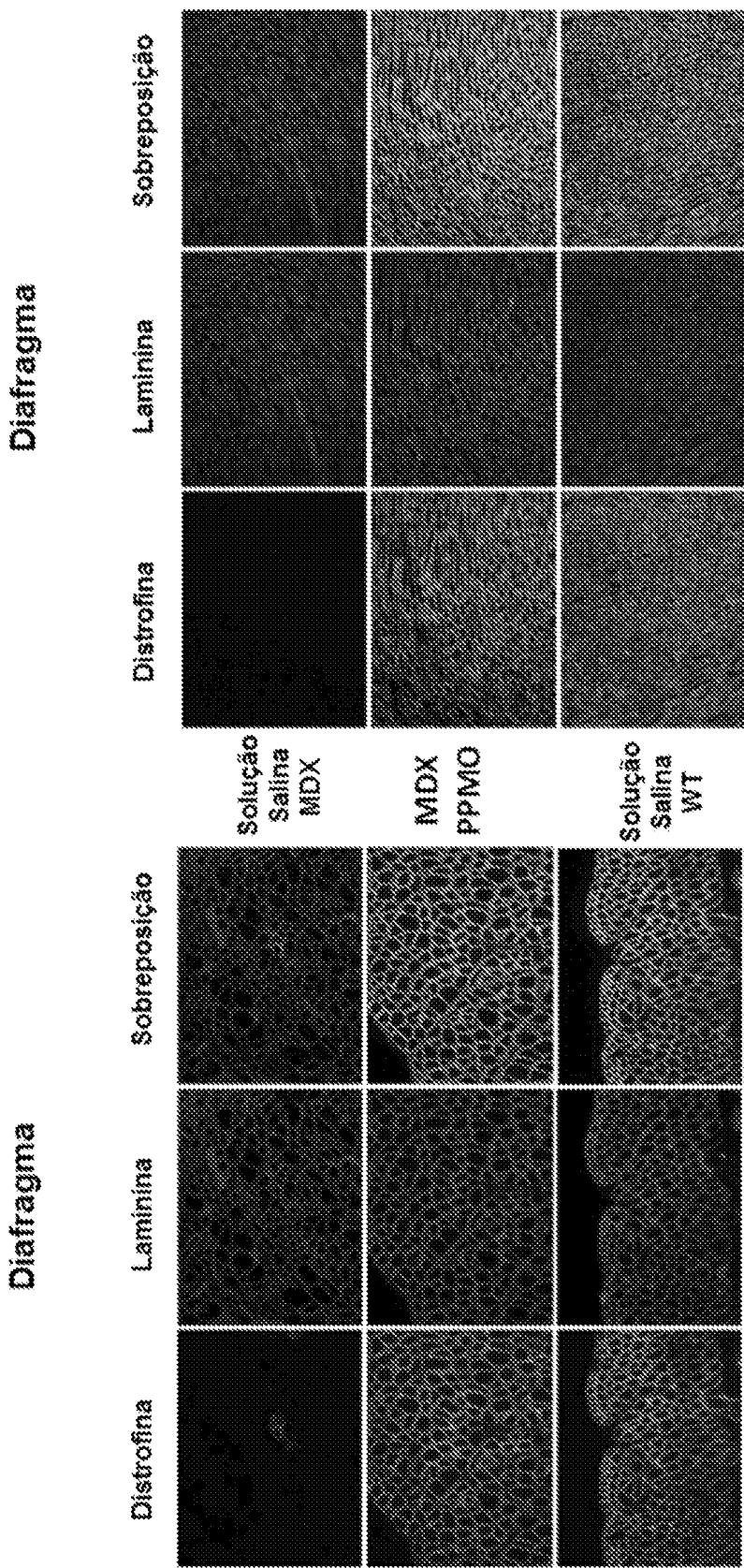
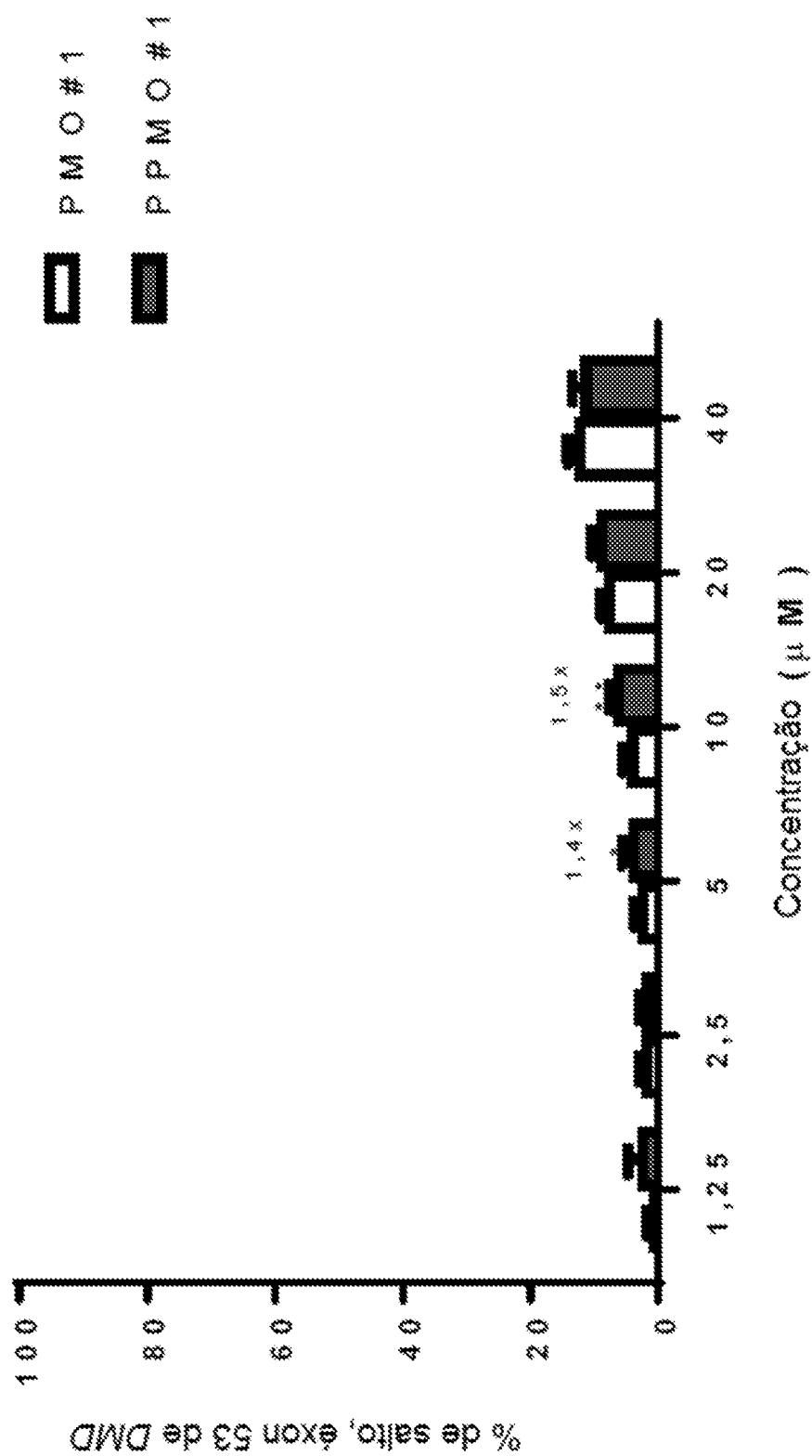


Figura 20



**"CONJUGADOS DE OLIGÔMERO DE SALTO DE ÉXON PARA DISTROFIA MUSCULAR"**

Trata-se de conjugados de oligômero antissenso complementares a um sítio alvo selecionado no gene da distrofia humana para induzir salto de éxon 53.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

**Código de Controle**

Campo 1



Campo 2



**Outras Informações:**

- Nome do Arquivo: 193670-0\_LISTAGEM DE SEQUÊNCIA.txt
- Data de Geração do Código: 18/06/2019
- Hora de Geração do Código: 17:32:13
- Código de Controle:
  - Campo 1: 669FF3AEA10E1563
  - Campo 2: E1490D5EFA6EE350