



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

(11) BR 122020021379-5 B1



(22) Data do Depósito: 23/10/2009

(45) Data de Concessão: 11/05/2021

(54) Título: OLIGÔMERO MORFOLINO FOSFORODIAMIDATO, COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE O MESMO E USO DO DITO OLIGÔMERO PARA TRATAR DISTROFIA MUSCULAR

(51) Int.Cl.: C12N 15/113.

(30) Prioridade Unionista: 24/10/2008 US 61/108,416.

(73) Titular(es): SAREPTA THERAPEUTICS, INC..

(72) Inventor(es): PETER SAZANI; RYSZARD KOLE.

(86) Pedido PCT: PCT US2009061960 de 23/10/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/048586 de 29/04/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 19/10/2020

(62) Pedido Original do Dividido: PI0920276-5 - 23/10/2009

(57) Resumo: São fornecidas moléculas antissentido capazes de se ligarem a um sítio alvo selecionado no gene da distrofina humana para induzir o salto de éxon, e métodos de utilização dos mesmos para o tratamento de distrofia muscular.

“OLIGÔMERO MORFOLINO FOSFORODIAMIDATO, COMPOSIÇÃO QUE COMPREENDE O MESMO E USO DO DITO OLIGÔMERO PARA TRATAR DISTROFIA MUSCULAR”

Dividido do PI 0920276-5, depositado em 23/10/2009.

Referência Cruzada para Pedido de Patente Relacionado

[001]Este pedido de patente reivindica o benefício, baseado no título 35 do Código dos Estados Unidos (U.S.C) § 119 (e), do Pedido Americano Provisório de Patente nº 61/108.416 depositado em 24 de outubro de 2008; sendo tal pedido provisório de patente aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Declaração sobre Listagem de Sequências

[002]A listagem de sequências associada a este pedido de patente é fornecida em formato de texto em vez de uma cópia em papel, e é incorporada por referência ao relatório descritivo. O nome do arquivo de texto contendo a listagem de sequências é 120178_410PC_SEQUENCE_LISTING.txt. O arquivo de texto apresenta 156 KB, foi criado em 23 de outubro de 2009 e está sendo submetido por via eletrônica através do EFS-Web.

Campo da Invenção

[003]A presente invenção se refere a novos compostos antisense e composições apropriadas para facilitar o salto de éxon no gene da distrofina humana. Ela também fornece métodos para induzir o salto de éxon utilizando as composições antisense adaptados para uso nos métodos da invenção.

Fundamento da Invenção

[004]Tecnologias antisense estão sendo desenvolvidas utilizando uma gama de produtos químicos para afetarem a expressão de genes em uma variedade de diferentes níveis (transcrição, “splicing”, estabilidade, tradução). Muito do que a investigação tem incidido sobre a utilização de compostos antisensos para corrigir ou compensar genes anormais ou doenças associadas em uma ampla gama de indicações.

Moléculas antisenso são capazes de inibir a expressão do gene com a especificidade, e por isso, os esforços de muitas pesquisas sobre oligonucleotídeos como moduladores da expressão gênica têm-se centrado sobre a expressão da inibição dos genes-alvo ou a função de elementos cis-atuantes. Os oligonucleotídeos antisensos são normalmente dirigidos contra RNA, ou a costa do sentido (por exemplo, o mRNA) ou fita-menos no caso de algumas metas de RNA viral. Para conseguir um efeito desejado de gene específico para baixo-regulamento, o oligonucleotídeos em geral, quer promover a degradação do mRNA alvo, tradução de bloco do mRNA ou bloquear a função de elementos cis-atuantes RNA, assim, efetivamente impedindo qualquer síntese de novo da proteína-alvo ou a replicação do RNA viral.

[005]No entanto, essas técnicas não são úteis quando o objeto é acima-regul- lar a produção da proteína nativa ou compensar as mutações que induzem a interrup- ção prematura da tradução como absurdo ou o quadro de mudança de mutações. Nestes casos, a transcrição de genes defeituosos não devem ser submetidos à de- gradação alvo ou inibição estérica, então a química oligonucleotídeo antisenso não deve promover alvo decaimento do mRNA ou a tradução de bloco.

[006]Em uma variedade de doenças genéticas, os efeitos das mutações sobre a eventual expressão de um gene pode ser modulado por um processo de exon alvo saltando durante o processo de “splicing”. O processo de “splicing” é dirigido por má- quinas componente multi-complexas, que traz cruzamentos adjacentes do exon-intron no pré-mRNA em proximidade e realiza a clivagem de ligações fosfodiéster nas extre- midades dos introns, com sua emenda posterior entre os exons que devem ser unidos. Esse processo complexo e de alta precisão é mediada por motivos de sequência no pre-mRNA que são relativamente curtos segmentos semi-conservadas RNA que se ligam a vários fatores de “splicing” nucleares que são depois envolvidos nas reações de “splicing”. Ao mudar a forma, a maquinaria de “splicing” lê ou reconhece os motivos envolvidos no processamento de pré-mRNA, é possível criar diferencialmente

moléculas emendadas de mRNA. Já foi reconhecido que a maioria dos genes humanos são alternativamente emendados durante a expressão do gene normal, embora os mecanismos envolvidos não foram identificados.

[007]Nos casos em que uma proteína funcional normalmente é encerrada prematuramente por causa das mutações nela, um meio para restaurar uma parte da produção de proteínas funcionais por meio da tecnologia antisensos tem demonstrado ser possível através de uma intervenção durante os processos de “splicing”, e que se exons associados com mutações causadoras de doenças pode ser especificamente excluídos de alguns genes, um produto protéico reduzido às vezes pode ser produzido com propriedades biológicas similares às das proteínas nativas ou tem atividade biológica suficiente para amenizar a doença causada por mutações associadas com o exon (Sierakowska, Sambade et al 1996;. Wilton , Lloyd et al 1999;. Janson Aartsma-Rus, et al 2004); Deutekom van, Bout Bremmer et al 2001;. Lu, Mann et al 2003... Kole et al. (Patente dos EUA Nos 5627274, 5916808, 5976879 e 5665593) divulgam os métodos de combater “splicing” aberrante usando análogos de oligonucleotídeos antisensos modificados que não promovem a decadência do alvo pré-mRNA. Bennett et al (Patente dos EUA n º 6210892) descrevem a modulação do processamento de mRNA antisensos do tipo selvagem celulares também a utilização de análogos de oligonucleotídeos antisensos que não induzem clivagem RNase H-mediada da RNA alvo.

[008]O processo de salto de exon alvo é provável ser particularmente útil nos genes longos, onde há muitos exões e intrões, onde há redundância na constituição genética dos exons ou quando uma proteína é capaz de funcionar sem um ou mais exons particulares. Os esforços para redirecionar o processamento do gene para o tratamento de doenças genéticas associadas com truncamentos causados por mutações em vários genes têm-se centrado sobre o uso de oligonucleotídeos antisensos que: (1), total ou parcialmente se sobrepõem com os elementos envolvidos no

processo de “splicing”, ou (2) ligam-se ao pré-mRNA em uma posição suficientemente próxima do elemento para perturbar a função de ligação e dos fatores de “splicing” que normalmente mediarão uma reação de “splicing” particular que ocorre nesse elemento.

[009]Distrofia muscular de Duchenne (DMD) é causada por um defeito na expressão da proteína distrofina. O gene que codifica a proteína contém 79 exons distribuídos por mais de 2 milhões de nucleotídeos do DNA. Qualquer mutação exônica que altera o quadro de leitura do exon, ou introduz um códon de parada, ou se caracteriza pela remoção de um a totalidade do exon quadro ou éxons de duplicação ou exons um ou mais tem o potencial de interromper a produção de distrofina funcional, resultando na DMD.

[0010]Uma forma menos grave de distrofia muscular, distrofia muscular de Becker (BMD), foi encontrada a surgir quando uma mutação, geralmente uma exclusão de um ou mais exons, resulta em um quadro de leitura correta junto a transcrição inteira da distrofina, que tal tradução de mRNA em proteína não está encerrado prematuramente. Se a união dos exons a montante e a jusante, na transformação de um mutante distrofina pré-mRNA mantém o quadro de leitura correta do gene, o resultado é um mRNA que codifica para uma proteína com um apagamento curto-circuito interno que mantém alguma atividade, resultando em um Becker fenótipo.

[0011]Eliminações de um exon ou exons que não alteram o quadro de leitura de uma proteína distrofina dar origem a um fenótipo da BMD, ao passo que uma deleção do exon que provoca um deslocamento de quadro dará origem a DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). Em geral, as mutações de distrofina, incluindo mutações e deleções do exon que alteram o quadro de leitura e, portanto, resultado da tradução de interrupção adequada de proteínas em DMD. Deve também ser observado que alguns pacientes com BMD e DMD têm deleções do exon abrangendo vários exons.

[0012]Apesar de as moléculas antisense puderem constituir uma ferramenta

no tratamento da distrofia muscular de Duchenne (DMD), tenta induzir o salto de éxon utilizando moléculas antisenso tiveram um sucesso misto. Um salto da distrofina do éxon 19 bem sucedido a partir da pré-mRNA distrofina foi alcançado utilizando-se uma grande variedade de moléculas antisenso direcionadas aos sítios de combinação flaqueadores ou motivos dentro do exon envolvido na definição do exon como descrito por Errington *et al.* (Errington, Mann et al. , 2003).

[0013]O primeiro exemplo de salto de éxon específico e reproduzível no modelo de camundongo mdx foi relatado por Wilton et al (Wilton, Lloyd et al. 1999). Ao dirigir uma molécula antisenso para o local fornecedor da tala, saltando exon 23 foi induzida no RNAm da distrofina até 6 horas de tratamento das células em cultura. Wilton et al descrevem também a segmentação da região aceitador da distrofina rato pré-mRNA com mais oligonucleotídeos antisensos. Enquanto o primeiro oligonucleotídeo antisenso direcionado ao sítio de emenda do intron 23 do doador induziu um salto de exon em mioblastos primários cultivados, este composto mostrou-se muito menos eficiente em culturas de células imortalizadas expressando altos níveis de distrofina.

[0014]Apesar destes esforços, ainda há uma necessidade de melhoria oligômeros antisensos direcionados para vários exons distrofina muscular e composições melhoradas de entrega e métodos para aplicações terapêuticas DMD.

Breve Sumário Da Invenção

[0015]Modalidades da presente invenção se referem geralmente a compostos antisensos capaz de se ligar a um alvo selecionado para induzir o salto de éxon, e métodos de utilização dos mesmos para induzir exon de deslizamento. Em certas modalidades, é possível combinar dois ou mais oligonucleotídeos antisensos da presente invenção juntos para induzir exon únicos ou múltiplos saltos.

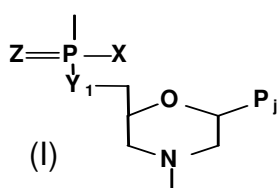
[0016]Em certas modalidades, é possível melhorar a exclusão de um único exon ou de múltiplos exons por covalentemente interligando duas ou mais moléculas

oligonucleotídeos antisensos (ver, por exemplo, Aartsma-Rus, Janson et al. 2004).

[0017]Em certas modalidades, os compostos antisensos da presente invenção induzem exon a saltar no gene da distrofina humana, e assim permitir que as células musculares para produzir uma proteína da distrofina funcional.

[0018]Os compostos de oligonucleotídeo antisenso (também aqui referidos como oligômeros) da presente invenção tipicamente: (i) constituem subunidades morfolinas e fósforo contendo ligações de intersubunidade para ingressar em um nitrogênio morfolino de uma subunidade de 5' carbono exocíclicos de uma subunidade adjacente, (ii) contêm entre 10-40 bases de nucleotídeos, preferencialmente 20-35 bases (iii) compreendem uma sequência de bases efetivas para hibridar com pelo menos 12 bases adjacentes de uma sequência alvo no exon pré-mRNA e induz a saltar a distrofina.

[0019]Em certas modalidades, os compostos antisensos da presente invenção podem compreender contendo fósforo de ligações de intersubunidades para ingressar em um nitrogênio morfolino de uma subunidade 5'carbono exocíclicos de uma subunidade adjacente, de acordo com a seguinte estrutura:



em que:

Y_1 é $-O-$, $-S-$, $-NH-$, ou $-CH_2-$;

Z é O ou S;

P_j é uma molécula de purina ou pirimidina de pareamento de bases efetivas para obrigar, por ligações de hidrogênio-base específica, para uma base em um polinucleotídeo; e

X é flúor, alquila opcionalmente substituída, alcóxi opcionalmente substituído,

opcionalmente substituído tioalcóxi, amino, alquilamino, opcionalmente substituída ou heterociclila opcionalmente substituídos.

[0020]Em certas modalidades, as ligações de intersubunidade acima, as quais são descarregadas, podem ser intercaladas com as ligações que estão carregadas positivamente em pH fisiológico, onde o número total de ligações com carga positiva é entre 2 e não mais de metade do número total de ligações. Por exemplo, as ligações com carga positiva podem ter a estrutura acima, na qual X é opcionalmente substituído uma piperazinil. Em outras modalidades, as ligações com carga positiva podem ter a estrutura acima, na qual X é substituído 1 piperazinil, caracterizado pelo 1 piperazinil ser substituído na posição 4, com uma porção alquila opcionalmente substituído Guanidinil.

[0021]Onde o composto antisensos administrado é eficaz para atingir um sítio de emenda de distrofina humana pré-processada, pode ter uma sequência de bases complementar a uma região-alvo que contenham pelo menos 12 bases contíguos em um RNA mensageiro pré processados (mRNA) transcrição distrofina humana. Sequências antisensos exemplares incluem aqueles identificados pela SEQ ID NOS: 1-569 e 612-633.

[0022]Em certas modalidades, uma sequência antisenso da presente invenção está contida em:

(a) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 1-20, preferencialmente SEQ ID NOS: 4, 8, 11 e 12, e mais preferivelmente IDNO SEQ: 12 para uso na produção do exon 44 no tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

(b) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 21-76 e 612-624, preferencialmente SEQ ID NOS: 27, 29, 34 e 39, e mais preferivelmente SEQ ID NO: 34 para uso na produção do exon 45 no processamento de mRNA distrofina humana pré-processados;

(c) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 77-125, preferencialmente SEQ ID NOS: 21 a 53, e mais preferivelmente SEQ ID NOS: 82, 84-87, 90 96, 98, 99 e 101, para uso na produção do exon 46 no tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

(d) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 126-169, preferencialmente SEQ ID NOS: 126-149, e mais preferivelmente SEQ ID NOS: 126, 128-130, 132, 144 e 146-149, para uso em produção do exon 47 no tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

(e) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 170-224 e 634, preferencialmente SEQ ID NOS: 170-201 e 634, e mais preferivelmente SEQ ID NOS: 176, 178, 181-183, 194 e 198-201, para uso na produção do exon 48 no tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

(f) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 225-266, preferencialmente SEQ ID NOS: 225-248, e mais preferivelmente SEQ ID NOS: 227, 229, 234, 236, 237 e 244-248, para uso em produção do exon 49 no tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

(g) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 267-308, preferencialmente SEQ ID NOS: 277, 287 e 290, e mais preferivelmente SEQ ID NO: 287, para uso na produção do exon 50 no tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

(h) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 309-371, preferencialmente SEQ ID NOS: 324, 326 e 327, e mais preferivelmente SEQ ID NO: 327 para uso na produção do exon 51 no tratamento de distrofina humana mRNA pré-processados;

(i) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 372-415, preferencialmente SEQ ID NOS: 372-397, e mais preferivelmente SEQ ID NOS: 379-382, 384, 390 e 392-395 para uso na produção saltando de exon 52 no tratamento de

humanos distrofina mRNA pré-processados;

(j) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 416-475 e 625-633, preferencialmente SEQ ID NOS: 428, 429 e 431, e mais preferivelmente SEQ ID NO: 429, para uso na produção do exon 53, o tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

(k) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 476-519, preferencialmente SEQ ID NOS: 476-499, e mais preferivelmente SEQ ID NOS: 479-482, 484, 489 e 491-493, para uso na produção de saltos do exon 54 no processamento de mRNA distrofina humana pré-processados, e

(l) qualquer uma das sequências identificadas por SEQ ID NOS: 520-569 e 635, preferencialmente SEQ ID NOS: 520-546 e 635, e mais preferivelmente SEQ ID NOS: 524-528, 537, 539, 540, 542 e 544, para uso na produção do exon 55 no tratamento de humanos distrofina mRNA pré-processados;

[0023]Em certas modalidades, o composto pode ser conjugado com um polipeptídeo arginina-rico eficaz para promover a absorção do composto nas células. Exemplos incluem os peptídeos identificados por SEQ ID NOS: 570-578, entre outros aqui descritos.

[0024]Em uma modalidade exemplar, o polipeptídeo arginina-rico é covalentemente acoplado em seu N-terminal ou resíduo C-terminal 3' ou 5' fim do composto anti-senso. Também em uma modalidade exemplar, o composto antisense é composto de subunidades morfolino e fósforo contendo ligações intersubunidade para ingressar em um nitrogênio morfolino de uma subunidade de um carbono 5' exocíclicos de uma subunidade adjacente.

[0025]Em geral, o conjugado de oligômero peptídeo pode ainda compreender um peptídeo "homing", que é seletivo para um tecido selecionado de mamíferos, ou seja, o mesmo tecido sendo alvejado pelo peptídeo células-penetrantes. O conjugado pode ser da forma: peptídeos penetradores de células - peptídeo "homing" - oligômero

antisensos, ou mais, preferencialmente, da forma: peptídeo “homing” - célula peptídeo penetrante - oligômero antisensos. Por exemplo, um composto de peptídeo conjugado para uso no tratamento da distrofia muscular de Duchenne, como descrito acima, pode ainda compreender um peptídeo “homing”, que é seletivo para o tecido muscular, como o peptídeo tendo a sequência identificada como SEQ ID NO: 579, conjugado com a pilha-penetrante do peptídeo conjugado. Exemplares deste tipo incluem aqueles representados aqui como CP06062-MSP-PMO (célula peptídeo penetrante - peptídeo “homing” - oligômero antisensos) e como MSP CP06062-PMO (peptídeo “homing” - peptídeo célula penetrante - oligômero antisensos) (ver SEQ ID NOs: 580 - 583).

[0026]Em algumas modalidades, o peptídeo é conjugado com o oligômero através de uma fração do vinculador. Em certas modalidades a fração vinculadora pode incluir um radical opcionalmente substituído piperazinil. Em outras modalidades, a fração vinculadora pode ainda compreender um beta alanina e / ou uma subunidade ácido 6-aminohexanóico. Em modalidades ainda, o peptídeo é conjugado diretamente para o oligômero sem uma porção de vinculador.

[0027]Conjugação do peptídeo a oligômero pode ser em qualquer posição adequada para formar uma ligação covalente entre os peptídeos e os oligômeros ou entre a metade e o ligante oligômero. Por exemplo, em algumas incorporações a conjugação do peptídeo pode ser na extremidade 3' do oligômero. Em outras modalidades, a conjugação do peptídeo a oligômero pode estar na extremidade 5' do oligômero. Em modalidades ainda, o peptídeo pode ser conjugado com o oligômero por qualquer uma das ligações intersubunidade.

[0028]Em algumas modalidades, o peptídeo é conjugado com o oligômero na extremidade 5' do oligômero. Em modalidades compreendendo contendo fósforo ligações intersubunidade, o peptídeo pode ser conjugado com o oligômero através de uma ligação covalente com o fósforo do grupo de ligação terminal. A conjugação desta

forma pode ser com ou sem a fração vinculadora descrita acima.

[0029] Ainda em outras modalidades, o peptídeo pode ser conjugado com o oligômero na extremidade 3' do oligômero. Em algumas modalidades novas, o peptídeo pode ser conjugado com o átomo de nitrogênio morfolino 3' terminal do oligômero grupo. A este respeito, o peptídeo pode ser conjugado com o oligômero diretamente ou através do agrupamento de vinculador descrito acima.

[0030] Em algumas modalidades, o oligômero pode ser conjugado a uma molécula que aumenta a solubilidade do oligômero em meio aquoso. Em algumas modalidades, a molécula que aumenta a solubilidade do oligômero em meio aquoso é um polietilenoglicol. Em modalidades ainda mais, a fração que aumenta a solubilidade do oligômero em meio aquoso é trietilenoglicol. Por exemplo, em algumas modalidades a fração que aumenta a solubilidade em meio aquoso pode ser conjugado com o oligômero na extremidade 5' do oligômero. Conjugação da fração que aumenta a solubilidade do oligômero em meio aquoso para o oligômero podem ser diretamente ou através da fração vinculadora descrita acima.

[0031] Certas modalidades da presente invenção fornecem moléculas antisensos selecionados e / ou adaptadas para ajudar no tratamento profilático ou terapêutico de um distúrbio genético que compreende pelo menos uma molécula de antisensos de forma adequada, para entrega a um paciente.

[0032] Certas modalidades da invenção fornecem métodos para tratar um paciente que sofre de uma doença genética em que há uma mutação em um gene que codifica uma determinada proteína e o efeito da mutação pode ser revogada por salto de éxon, compreendendo as etapas de: (a) seleção uma molécula antisensos em conformidade com os métodos descritos neste documento, e (b) administrar a molécula a um paciente em necessidade de tal tratamento. A presente invenção também inclui o uso de purificadas e isoladas oligonucleotídeos antisensos da invenção, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença genética.

[0033] Certas modalidades fornecem um método de tratamento da distrofia muscular, como uma condição caracterizada por distrofia muscular de Duchenne, cujo método compreende administrar a um paciente com necessidade de tratamento uma quantidade eficaz de um oligonucleotídeo antisense adequadamente concebido, como aqui descrito, relevantes para a genética particular lesão ao paciente. Além disso, certas modalidades fornecer um método para tratar um paciente de forma profilática para evitar ou pelo menos minimizar a distrofia muscular, incluindo a distrofia muscular de Duchenne, compreendendo a etapa de: administração ao paciente de uma quantidade efetiva de um oligonucleotídeo antisense ou uma composição farmacêutica compreendendo uma ou mais dessas moléculas biológicas.

[0034] Certas modalidades se referem aos métodos de tratamento da distrofia muscular em um indivíduo, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um composto substancialmente descarregado antisensos contendo 20-35 morfolino subunidades ligadas por vínculos de fósforo contendo intersubunidades para ingressar em um nitrogênio morfolino de uma subunidade para 5' carbono exocíclicos de uma subunidade adjacente, que compreende uma sequência selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 1-569 e 612-635, e capaz de formar com a sequência complementar do mRNA em um exon gene da distrofina, uma estrutura heteroduplex entre dito composto e mRNA ter um T_m de pelo menos 45 °C, onde o exon é selecionado do grupo consistindo de éxons 44-55.

[0035] Em certas modalidades, a distrofia muscular é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). Em certas modalidades, a distrofia muscular é distrofia muscular de Becker (BMD).

[0036] Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 1-20, e no exon é exon 44. Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 21-76 e 612-624, e no exon é exon 45.

[0037]Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 77-125, e do exon é exon 46. Em certas modalidades, a sequência selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 126-169, e no exon é exon 47.

[0038]Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 170-224 e 634, e no exon é exon 48. Em certas modalidades, a sequência selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 225-266, e no exon é exon 49.

[0039]Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 267-308, e no exon é exon 50. Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 309-371, e no exon é exon 51.

[0040]Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 372-415, e no exon é exon 52. Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 416-475 e 625-633, e no exon é exon 53. Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 476-519, e no exon é exon 54. Em certas modalidades, a sequência é selecionada do grupo consistindo SEQ ID NOS: 520-569 e 635, e no exon é exon 55. Em certas modalidades, a sequência compreende ou consiste essencialmente de SEQ ID NO: 287.

[0041]Certas modalidades fornecem kits para o tratamento de uma doença genética, que os kits incluem pelo menos um oligonucleotídeo antisensos da presente invenção, acondicionada em um recipiente apropriado e instruções para seu uso.

[0042]Estes e outros objetos e os recursos serão mais bem compreendidos quando a seguinte descrição detalhada da invenção for considerada em conjugação com as figuras.

Breve Descrição Das Figuras

[0043]Figura 1A mostra uma estrutura exemplar morfolina oligômero com uma ligação fosforodiamidate.

[0044]Figura 1B mostra um conjugado de um peptídeo rico em arginina e um oligômero antisensos, de acordo com uma modalidade da invenção.

[0045]Figura 1C mostra um conjugado como na Figura 1B, caracterizado pelas ligações de base contendo um ou mais grupos carregados positivamente.

[0046]Figuras 1D-G mostram o segmento subunidade de repetição de oligonucleotídeos morfolino exemplar, designado D a G.

[0047]Figura 2A mostra a posição relativa e os resultados de um exame de oligômero antisensos exon 51 projetada para induzir o salto do exon 51 distrofina humana.

[0048]Figura 2B-C mostra a atividade relativa em rabdomiossarcoma humanos cultivados (RD) e células humanas em células primárias de músculo esquelético dos três melhores oligômeros selecionado a partir do exon 51 scan (SEQ ID NOs: 324, 326 e 327) em relação às sequências (AVI- 5658; SEQ ID NO: 588 e h51AON1; SEQ ID NO: 594) que são eficazes na indução exon 51 saltos. Figura 2D mostra a posição relativa dentro do exon 51 de três oligômeros selecionado em comparação com determinadas sequências.

[0049]Figura 3A mostra a posição relativa e os resultados de um oligômero antisensos exon 50 de digitalização para a indução do exon 50 distrofina humana em comparação com outras sequências do exon 50 que induzem a saltar.

[0050]Figura 3B mostra a localização relativa e atividade de sequências antisensos selecionados a partir do exon 50 scan (SEQ ID NOS: 277, 287, 290 e 291) em comparação com outras sequências (SEQ ID NOS: 584 e 585).

[0051]Figura 4A mostra a posição relativa e os resultados de um oligômero antisensos exon 53 de digitalização para a indução do exon distrofina humana 53. Figura 4B mostra a posição relativa de certas sequências utilizadas para comparar a atividade exon-salto dos oligômeros selecionados como sendo mais ativas no exon 53 de digitalização.

[0052]Figuras 4C-F mostram os resultados dos estudos de dosagem, resumidos na Figura 4G, utilizando os oligômeros selecionados como sendo o mais eficaz no exon 53 scan (SEQ ID NOS: 422, 428, 429 e 431).

[0053]Figuras 4H e 4I mostram a atividade relativa de certas sequências (SEQ ID NOS: 608-611) em comparação com a atividade do oligômero mais ativo de salto de exon 53 (SEQ ID NO: 429) em ambas as células RD humanos e células primárias de músculo esquelético.

[0054]Figura 5A mostra a posição relativa e os resultados de um exame de oligômero antisenso de exon 44 de digitalização para a indução do exon distrofina humana 44. A Figura 5B mostra a posição relativa dentro do exon 44 de certas sequências utilizadas para comparar a atividade de salto de exon para os oligômeros selecionados como sendo mais ativos no exame do exon 44.

[0055]Figuras 5C-G mostram os resultados dos estudos de dosagem, resumidos na Figura 5H, utilizando os oligômeros selecionados como sendo o mais eficaz no exon 44 scan (SEQ ID NOS: 4, 8, 11, 12 e 13).

[0056]Figuras 5I e 5J mostram a atividade relativa de certas sequências (SEQ ID NOS: 600-603) em comparação com a atividade do oligômero mais ativo de salto de exon 53 (SEQ ID NO: 12) em ambas as células RD e células primárias do músculo esquelético humano.

[0057]Figura 6A mostra a posição relativa e os resultados de um exame de oligômero antisenso de exon 45 para a indução do exon 45 da distrofina humana. A Figura 6B mostra a posição relativa dentro do exon 45 de certas sequências utilizadas para comparar a atividade de salto de exon para os oligômeros selecionados como sendo mais ativos no exame do exon 45.

[0058]As Figuras 6C-F mostram os resultados dos estudos de dosagem, resumidos na Figura 6H, utilizando os oligômeros selecionados como sendo os mais eficazes no exame do exon 45 (SEQ ID NOS: 27, 29, 34 e 39). Figura 6G usa um

oligômero relativamente inativo (SEQ ID NO: 49) como controle negativo.

[0059]Figuras 6I e 6J mostram a atividade relativa de certas sequências (SEQ ID NOS: 604-607) em comparação com a atividade do oligômero mais ativos de salto de exon 53 (SEQ ID NO: 34) em ambas as células RD e células primárias de músculo esquelético humano.

Descrição Detalhada da Invenção

[0060]Modalidades da presente invenção dizem respeito à melhoria geral antisensos compostos, e métodos de utilização dos mesmos, que são projetados especificamente para induzir o salto de éxon do gene da distrofina. Distrofina desempenha um papel vital na função muscular, e várias doenças músculo-relacionados são caracterizadas por formas mutantes do gene. Assim, em certas modalidades, os compostos antisensos melhoraram aqui descritos induziram salto de exon em formas mutantes do gene da distrofina humana, tais como os genes mutados encontrados distrofina na distrofia muscular de Duchenne (DMD) e distrofia muscular de Becker (BMD, na sigla em inglês).

[0061]Devido a eventos aberrantes de "splicing" de mRNA causados por mutações, esses genes mutantes da distrofina humana, quer expressar a proteína distrofina defeituosa ou não expressam distrofina mensuráveis em tudo, uma condição que leva a várias formas de distrofia muscular. Para remediar esta condição, os compostos antisensos da presente invenção tipicamente hibridizam-se a regiões selecionadas de um RNA pré-processado de um gene da distrofina humana mutante, induzem salto de exon e "splicing" diferencial nesta outra forma distrofina de mRNA aberrantemente emendado, e assim permitir que as células musculares produzam um mRNA transcrito que codifica uma proteína funcional da distrofina. Em certas modalidades, a proteína da distrofina resultante não é necessariamente uma forma do "tipo selvagem" de distrofina, mas é sim uma truncada, ainda funcional ou semi-funcional, forma de distrofina.

[0062]Ao aumentar os níveis da proteína distrofina em células musculares funcionais, modalidades essas e outras podem ser úteis na profilaxia e no tratamento da distrofia muscular, especialmente as formas de distrofia muscular, como a DMD e BMD, que são caracterizados pela expressão de distrofina defeituosa proteínas devido à combinação de mRNA aberrante. Os oligômeros específicos descritos neste documento prever ainda melhor, distrofina-exon específicas destinadas a mais de oligômeros de outros em uso e, portanto, oferecem vantagens significativas e práticas sobre métodos alternativos de tratamento de formas relevantes de distrofia muscular.

[0063]A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados aqui têm o mesmo significado que comumente entendido por aqueles que sejam versados na técnica à qual pertence a invenção. Embora todos os métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos neste documento podem ser utilizados na prática ou testes da presente invenção, métodos preferidos e os materiais são descritos. Para efeitos da presente invenção, os seguintes termos são definidos abaixo.

Definições

[0064]Os artigos "a" e "um" são aqui usados para se referir a um ou a mais de um (ou seja, a pelo menos um) do objeto gramatical do artigo. A título de exemplo, um "elemento" designa um elemento ou mais de um elemento.

[0065]Por "sobre" significa uma quantidade, nível, valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento que varia em até 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 ou 1% para uma quantidade de referência, o nível, valor, número, frequência, porcentagem, dimensão, tamanho, quantidade, peso ou comprimento.

[0066]Por "sequência de codificação" entende-se qualquer sequência de ácido nucléico que contribui para o código do produto polipeptídico de um gene. Em contrapartida, a "sequência não codificante" refere-se a qualquer sequência de ácido

nucléico que não contribui para o código do produto polipeptídico de um gene.

[0067]Ao longo desta especificação, salvo disposições em contrário, a expressão "compreendem", "compreende", e "com" será entendido que implicam a inclusão de uma etapa declarado ou elemento ou grupo de etapas ou elementos, mas não a exclusão de qualquer outra etapa ou elemento ou grupo de passos ou elementos.

[0068]Por "constituído por" significa, inclusive, sendo limitado a, o que segue a frase "que consiste em." Assim, a frase "que consiste em" indica que os elementos constantes são necessários ou obrigatórios, e que nenhum outro elemento pode estar presente. Por "consiste essencialmente de" destina-se, incluindo os elementos enumerados após a frase, e limitado a outros elementos que não interferem ou contribuem para a atividade ou ação especificada na divulgação para os elementos listados. Assim, a frase "que consiste essencialmente de" indica que os elementos constantes são necessários ou obrigatórios, mas que outros elementos são opcionais e podem ou não estar presentes, dependendo de se ou não afetar materialmente a atividade ou ação dos elementos listados.

[0069]O termo "complementar" e "complementaridade" se referem à polinucleotídeos (isto é, uma sequência de nucleotídeos) em relação às regras de pareamento. Por exemplo, a sequência "AGT," é complementar à sequência "TCA". Complementaridade pode ser "parcial", em que apenas algumas das bases dos ácidos nucléicos são combinados de acordo com o emparelhamento de bases de regras. Ou, pode haver "completa" ou "total" a complementaridade entre os ácidos nucléicos. O grau de complementaridade entre as vertentes de ácido nucléico tem efeitos significativos sobre a eficácia e força de hibridação entre vertentes do ácido nucléico. Enquanto a complementaridade perfeita é muitas vezes desejada, algumas modalidades podem incluir uma ou mais, mas preferencialmente com 6, 5, 4, 3, 2, ou uma inadequação em relação ao RNA alvo. Variações em qualquer local dentro do oligômero estão incluídos. Em certas modalidades, as variações na sequência de perto os

términos de um oligômero são geralmente preferíveis às variações no interior, e se apresentam são tipicamente dentro de cerca de 6, 5, 4, 3, 2 ou 1 nucleotídeos da terminação 5' e/ou 3'.

[0070]Os termos "peptídeo penetrante de célula" ou "CPP" são usados indistintamente e referem-se a peptídeos catiônicos penetrantes de células, também chamados de peptídeos de transporte, peptídeos transportadora, ou domínios de transdução de peptídeo. Os peptídeos, como mostrado aqui, têm a capacidade de induzir a penetração de celulares no prazo de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% das células de uma população de cultura de células, incluindo todos os inteiros entre os dois, e permitir a translocação de macromoléculas em tecidos múltiplos in vivo após administração sistêmica.

[0071]Os termos "oligômero antisense" ou "composto antisense" são usados indistintamente e se referem a uma sequência de subunidades cíclicas, cada um tendo uma porção de pareamento, ligadas por vínculos intersubunidade que permitem que as metades de pareamento para hibridar com uma sequência alvo de um ácido nucléico (geralmente um RNA) por Watson-Crick emparelhamento de base, para formar um ácido nucléico: heteroduplex oligômero dentro da sequência alvo. As subunidades cíclicas são baseadas em ribose ou outra pentose, ou, em uma modalidade preferida, um grupo de morfolino (ver descrição dos oligômeros morfolino abaixo).

[0072]Tal oligômero antisense pode ser projetado para bloquear ou inibir a tradução de mRNA ou para inibir o processamento natural do pré-mRNA emendado, e pode ser considerado "dirigido a" ou "dirigido contra" uma sequência-alvo com o qual hibridiza. Em certas modalidades, a sequência alvo inclui uma região, incluindo um códon de iniciação agosto de mRNA, a 3' ou 5' local da tala do pré mRNA processado, ou um ponto de ramificação. A sequência alvo pode ser dentro de um exon ou dentro de um íntron. A sequência alvo de um sítio de emenda pode incluir uma sequência de mRNA que tenha a sua extremidade 5' de 1 a cerca de 25 pares de base a jusante de

um cruzamento normal aceitador da tala no mRNA preprocessado. Uma sequência alvo preferencial de uma emenda é qualquer região de um mRNA preprocessado que inclui um sítio de emenda ou está contida inteiramente dentro de uma sequência de codificação ou exon abrange um aceitador da tala ou local doador. Um oligômero é mais geral a ser dito "dirigidas contra" um alvo biologicamente relevantes, como uma proteína do vírus, ou bactérias, quando é dirigido contra o ácido nucléico do alvo na forma descrita acima. Incluído são oligômeros antisensos que compreendem, consistem essencialmente de, ou consistir em uma ou mais das SEQ ID NOS: 1-569 e 612-635. Também estão incluídas as variantes destes oligômeros antisensos, incluindo oligômeros variante com 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% ou 99% (incluindo todos os inteiros entre eles) homologia identidade sequência ou a qualquer um das SEQ ID NOS: 1-569 e 612-635, e/ou variantes que diferem essas sequências através de cerca de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10 nucleotídeos, preferencialmente aquelas variantes que induzem exon saltando de um ou mais exons selecionados distrofina humana. Também estão incluídos os oligômeros de qualquer em um ou mais de SEQ ID NOS :584-611 e 634-635, que compreendem um número adequado de ligações cobrados, como aqui descrito, por exemplo, até cerca de 1 por cada 2-5 ligações descarregadas, como cerca de 4-5 por cada 10 ligações descarregadas, e/ou que compreende um peptídeo Arg-ricos em anexo, como também aqui descritos.

[0073]Os termos "oligômeros morfolidos" ou "PMO" (fosforomidatos ou fosforodiamidate oligômero morfolido) se referem a um oligonucleotídeoanalógico composto por estruturas subunidade morfolido, onde (i) as estruturas são ligadas entre si por ligações contendo fósforo, 1-3 átomos de comprimento, preferencialmente, dois átomos de comprimento, e preferencialmente sem carga ou catiônicos, juntando-se o nitrogênio morfolido de uma subunidade de 5' carbono exocíclicos de uma subunidade adjacente, e (ii) cada anel morfolido tem uma porção de purina ou pirimidina de pareamento de bases efetivas para obrigar, por pontes de hidrogênio base específica,

para uma base em um polinucleotídeo. Ver, por exemplo, a estrutura na Figura 1A, que mostra um tipo de ligação preferida fosforodiamidate. As variações podem ser feitas a essa ligação, desde que não interfiram com a ligação ou atividade. Por exemplo, o oxigênio ligado ao fósforo pode ser substituído por enxofre (tiofosforodiamidate). A 5' oxigênio pode ser substituído com amino ou alquila inferior substituído amino. O pingente de nitrogênio ligado ao fósforo pode ser insubstituído, monossubstituído ou dissustituídos com (opcionalmente substituído) alquila inferior. Veja também a discussão de ligações catiônicas abaixo. A síntese, estruturas e características de ligação de oligômeros morfólicos estão detalhadas nas Patentes dos EUA N°s 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5521063 e 5506337, e PCT/US07/11435 (ligações catiônicas), os quais são incorporados por referência.

[0074]A porção de base de purina ou pirimidina de emparelhamento é tipicamente adenina, guanina, citosina, uracila, timina ou inosina. Também estão incluídas as bases como piridina-4-ona, piridina-2-ona, fenil, pseudo uracil, 2,4,6-trime115toxi benzeno, 3-metil-uracil, dihidrouridine, naftila, aminofenil, 5-alquillcitidines (por exemplo, 5-metilcitidina), 5-alquiluridinas (por exemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por exemplo, 5-bromouridina) ou 6-azapirimidinaes ou 6-alquilpirimidinas (por exemplo, 6-metilluridina), quesosine propino, 2-tiouridina, 4-tiouridina wybutosine, wybutoxosine, 4-acetilidina, 5-uridina (carboxihidroximetil), 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridine, β -D-galactosilqueosine, 1-metiladenosine, 1-metilinosine, 2,2-dimetilguanosine, 3-metilcitidine, 2-metiladenosine, 2metilguanosine, N6-metiladenosine, 7-metilguanosine, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridine, 5-metilcarbonihnetiluridine, 5-metiloxiuridine, 5-metil-2-tiouridina, 2-metiltio-N6 isopenteniladenosine-, β -D-mannosilqueosine ácido uridina-5-oxiacetic, 2-thiocitidine, treonina e outros derivados (Burgin et al, 1996, Bioquímica, 35,14090; Uhlman & Peyman, supra). Por "bases modificadas" neste aspecto é significativo outras bases de nucleotídeos de adenina (A), guanina (G), citosina (C),timina (T) e

uracila (U), como ilustrado acima, essas bases podem ser usadas no qualquer posição na molécula antisensos. Pessoas versadas na técnica que vão apreciar, dependendo das utilizações dos oligômeros, TS e nos são intercambiáveis. Por exemplo, com outras químicas, tais como oligonucleotídeos antisensos 2'-O-metilantisenso RNA, que são mais semelhantes, as bases T pode ser mostrado como U(ver, por exemplo, Sequencce Identificação da lista).

[0075]Uma "subunidade de aminoácidos" ou "resíduo de aminoácido" pode se referir a um resíduo de ácido α -aminoácido (por exemplo, o CO-NH-CHR) ou a um β - ou outro resíduo de aminoácido (por exemplo, -CO-(CH₂)-NCHR NH), onde R é uma cadeia lateral (que podem incluir o hidrogênio) e n é 1-6, preferivelmente 1-4.

[0076]O "amino ácido naturalmente ocorrente" refere-se a um aminoácido presente em proteínas encontradas na natureza, como o 20 (L)-amino ácidos utilizados durante a biossíntese de proteínas, assim como outros, tais como 4-hidroxiprolina hidroxilisina, desmosina, Isodesmosina, citrulina homocisteína, e ornitina. O termo "não-natural de aminoácidos" refere-se aos aminoácidos presentes nas proteínas não encontradas na natureza, exemplos incluem a beta-alanina (β -Ala, ou B), ácido 6-amino hexanóico (AHX) e 6 ácido amino pentanóico. Outros exemplos de "não-aminoácidos naturais" incluem, sem limitação, os ácidos (D)-amino, Norleucina, norvaline, p-fluor-fenilalanina Etionina e similares, que são conhecidos por um versado na técnica.

[0077]Uma "quantidade eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" se refere a uma quantidade de compostos terapêuticos, como um oligômero antisensos, administrado a um assunto de mamíferos, ou como dose única ou como parte de uma série de doses, que é eficaz para produzir uma resposta desejada fisiológica ou efeito terapêutico no assunto. Um exemplo de uma resposta fisiológica desejada inclui aumento da expressão de uma forma relativamente funcional ou biologicamente ativa da proteína distrofina, principalmente nos tecidos musculares ou células que contêm uma proteína distrofina defeituosa ou não distrofina, em comparação não

oligômero antisensos ou um oligômero de controle. Exemplos de efeitos terapêuticos desejados incluem, sem limitação, as melhorias nos sintomas ou patologia da distrofia muscular, reduzir a progressão dos sintomas ou patologia de distrofia muscular e retardar o aparecimento de sintomas ou patologias de distrofia muscular, entre outros. Exemplos de tais sintomas incluem o atraso, a fadiga mental, fraqueza muscular, dificuldades com habilidades motoras (por exemplo, correr, saltar, pular), quedas freqüentes e dificuldade para caminhar. A patologia de distrofia muscular pode ser caracterizada, por exemplo, os danos das fibras musculares e vazamento de membrana. Para um oligômero antisensos, este efeito é normalmente provocado pela alteração do processamento de emenda de uma sequência alvo selecionado (por exemplo, a distrofina), de modo a induzir salto de exon.

[0078]Um "exon" se refere a uma seção definida do ácido nucléico que codifica para uma proteína, ou uma sequência de ácido nucléico que é representado sob a forma madura de uma molécula de RNA após uma porção de um préprocessado (ou precursores) RNA foram removidos por "splicing". A molécula de RNA maduro pode ser um RNA mensageiro (mRNA) ou uma forma funcional de uma RNA não-codificante, como rRNA ou tRNA. O gene da distrofina humana tem cerca de 75 exons.

[0079]Um "intron" se refere a uma região de ácido nucléico (dentro de um gene) que não é traduzida em uma proteína. Um íntron é uma seção não-codificante que é transcrito em um precursor de mRNA (pré-mRNA) e, posteriormente, removido por "splicing" durante a formação do RNA maduro.

[0080]"Salto de exon" geralmente se refere ao processo pelo qual um exon inteiro, ou parte dele, é removido de um determinado RNA pré-processada, e é excluída de estar presente no RNA maduro, como o mRNA maduro que se traduz em uma proteína. Assim, a porção da proteína que é codificada pelo contrário ignorado exon não está presente na forma expressa da proteína, geralmente criando uma alteração, ainda que funcional, a forma da proteína. Em certas modalidades, o exon ser ignorado

é uma aberrante exon do gene da distrofina humana, que pode conter uma mutação ou outra alteração em sua sequência que, de outra maneira, causa "splicing" aberrante. Em certas modalidades, o exon ser ignorado é qualquer um ou mais dos éxons 1-75 do gene da distrofina, embora qualquer um ou mais dos exons 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, e / ou 55 do gene da distrofina humana são os preferidos.

[0081]"Distrofina" é uma proteína em forma de bastonete citoplasmática, e uma parte vital do complexo de proteína que liga o citoesqueleto da fibra muscular ao redor da matriz extracelular através da membrana celular. Distrofina contém vários domínios funcionais. Por exemplo, a distrofina contém um domínio de ligação de actina em cerca de aminoácidos 14-240 e um domínio de haste central em cerca de aminoácidos 253-3040. Este domínio grande central é formado por 24 espectrina-como elementos do triplo-helicoidal de aproximadamente 109 aminoácidos, que têm homologia com actinina alfa-espectrina e outras. As repetições são normalmente interrompidas por quatro segmentos ricos em prolina não repetidas, também conhecido como dobradiça de regiões. Repete 15 e 16 são separadas por um trecho de 18 aminoácido que parece fornecer um importante sítio de clivagem proteolítica da distrofina. A identidade de sequência entre a maioria dos intervalos repete 10-25%. Uma repetição contém três alfa-hélices: 1, 2 e 3. Alfa-hélices 1 e 3 são cada uma formada por sete voltas da hélice, provavelmente, interagindo como uma bobina enrolada, através de uma interface de interação hidrofóbica. Alfa-hélice-2 tem uma estrutura mais complexa e é formado por segmentos de quatro e três voltas da hélice, separados por um Glicina ou resíduo de prolina. Cada repetição é codificada por dois éxons, geralmente interrompida por um íntron entre os aminoácidos 47 e 48 na primeira parte da hélice alfa-2. O intron outro é encontrado em diferentes posições na repetição, normalmente espalhadas por hélice-3. Distrofina também contém um domínio rico em cisteína, a cerca de aminoácidos 3080-3360), incluindo um segmento rico em cisteína, (ou seja, 15 cisteínas em 280 aminoácidos) mostrando homologia com o domínio C-terminal do

discoideum (*Dictyostelium discoideum*) alfa-actinina. O domínio carboxi-terminal está em sobre aminoácidos 3361-3685.

[0082]O amino-terminal da distrofina liga a F-actina e se liga carboxi-terminal do complexo distrofina-associado (DAPC) no sarcolema. O DAPC inclui o distroglicanas, proteínas sarcoglicanas, integrinas e caveolina, e as mutações em qualquer um destes componentes causa hereditária autossômica distrofias musculares. O DAPC é desestabilizado quando a distrofina está ausente, o que resulta em níveis diminuídos das proteínas membro, e por sua vez leva ao dano da fibra progressiva e vazamento de membrana. Em várias formas de distrofia muscular, tais como a distrofia muscular de Duchenne (DMD) e distrofia muscular de Becker (BMD), as células musculares produzem uma forma alterada e funcionalmente defeituosa da distrofina, ou nenhuma distrofina em tudo, principalmente devido às mutações na sequência do gene que leva ao "splicing" incorreto. A expressão predominante da proteína distrofina defeituosa, ou a total ausência de distrofina, uma proteína distrofina ou semelhante, leva à rápida progressão da degeneração muscular, como indicado acima. A este respeito, uma proteína distrofina "defeituosa" pode ser caracterizada pelas formas de distrofina, que são produzidos em determinados assuntos com DMD ou BMD, como é conhecido na técnica, ou pela ausência de distrofina detectável.

Tabela A fornece uma ilustração da distrofina em vários domínios, os resíduos de aminoácidos que circundam essas áreas, e os exons que codificam eles.

Tabela A

Domínio	Subdomínio	Resíduo Nos	Exons
Domínio de ligação de actina		14-240	2-8
Domínio da haste central		253-3040	8-61
	Dobradiça 1	253-327	(8)-9
	Repetido 1	337-447	10-11

	Repetido 2	448-556	12-14
	Repetido 3	557-667	14-16
	Dobradiça 2	668-717	17
	Repetido 4	718-828	(17)-20
	Repetido 5	829-934	20-21
	Repetido 6	935-1045	22-23
	Repetido 7	1046-1154	(23)-(26)
	Repetido 8	1155-1263	26-27
	Repetido 9	1264-1367	28-(30)
	Repetido 10	1368-1463	30-32
	Repetido 11	1464-1568	32-(34)
	Repetido 12	1569-1676	34-35
	Repetido 13	1677-1778	36-37
	Repetido 14	1779-1874	38-(40)
	Repetido 15	1875-1973	40-41
	Interrupção	1974-1991	42
	Repetido 16	1992-2101	42-43
	Repetido 17	2102-2208	44-45
	Repetido 18	2209-2318	46-48
	Repetido 19	2319-2423	48-50
	Dobradiça 3	2424-2470	50-51
	Repetido 20	2471-2577	51-53
	Repetido 21	2578-2686	53-(55)
	Repetido 22	2687-2802	55-(57)
	Repetido 23	2803-2931	57-59
	Repetido 24	2932-3040	59-(61)
	Dobradiça 4	3041-3112	61-64
Domínio rico em cisteína		3080-3360	63-69
	Sítio de ligação distroglicana	3080-3408	63-70
	Domínio WW	3056-3092	62-63

	EF-mão 1	3130-3157	65
	EF-mão 2	3178-3206	65-66
	Domínio ZZ	3307-3354	68-69
Carboxi-terminal domínio		3361-3685	70-79
	Sítio de ligação alfa 1-sintro- fina	3444-3494	73-74
	Sítio de ligação beta 1-sintro- fina	3495-3535	74-75
	Repetido (Leu)6-septeto	3558-3593	75

[0083]Como usado aqui, os termos "função" e "funcionais" e afins se referem a uma função biológica, enzimáticas, ou terapêuticas.

[0084]Uma proteína distrofina "funcional" geralmente se refere a uma proteína distrofina com atividade biológica suficiente para reduzir a degradação progressiva do tecido muscular que é outra característica da distrofia muscular, geralmente em relação à alteração ou "defeituosa" forma de proteína distrofina que está presente em determinados assuntos com DMD ou BMD. Em certas modalidades, uma proteína distrofina funcional pode ter cerca de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, ou 100% (incluindo todos os inteiros entre eles) do in vitro ou in vivo da atividade biológica de distrofina do tipo selvagem, como medido de acordo com técnicas de rotina no art. Como um exemplo, a atividade relacionada com distrofina muscular em culturas in vitro pode ser medido de acordo com o tamanho dos miofibrilos, organização miofibrilar (ou desorganização), a atividade contrátil, e a aglomeração espontânea de receptores de acetilcolina (ver, por exemplo, Brown et al. Journal of Cell Ciência. 112:209-216, 1999). Os modelos animais também são recursos valiosos para o estudo da patogênese da doença, e fornecer um meio para testar a atividade da distrofina-relacionados. Dois dos modelos mais utilizados animais para pesquisa DMD são o camundongo mdx e golden retriever a distrofia muscular (GRMD) cão, ambos os quais são distrofina negativa (ver, por

exemplo, Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172 , 2003). Estes e outros modelos animais podem ser usados para medir a atividade funcional de proteínas distrofinas diversos. Incluído são truncados formas de distrofina, tais como os formulários que são produzidos por alguns dos compostos exon-saltados antisensos da presente invenção.

[0085] Por "gene" entende-se uma unidade de herança que ocupa um locus específico em um cromossomo e consiste em transcrição e / ou translação sequências reguladoras e / ou de uma região de codificação e / ou não-traduzida de sequências (ou seja, íntrons, 5' e 3' sequências não traduzidas).

[0086] Por "isolado" se destina o material que é substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente o acompanham em seu estado nativo. Por exemplo, um "polinucleotídeo isolado", como aqui utilizado, pode se referir a um polinucleotídeo que foi purificado ou removido a partir das sequências que flanqueiam-no em um estado que ocorre naturalmente, por exemplo, um fragmento de DNA que foi removido a partir das sequências que normalmente são adjacentes ao fragmento.

[0087] Por "melhora" ou "melhoramento", ou "aumentar" ou "aumento", ou "estimular" ou "estímulo", entende-se geralmente a habilidade de um ou mais composto(s) ou composição (ões) antissentindo para produzir ou causar resposta fisiológica aumentada (isto é, efeitos "downstream") em uma célula ou indivíduo, como comparado à resposta causada tanto por composto antisenso quanto por composto de controle. Uma resposta fisiológica mensurável pode incluir expressão aumentada de uma forma funcional de uma proteína de distrofina, ou atividade biológica aumentada relacionada à distrofina em tecidos musculares, entre outras respostas resultantes da compreensão da arte e da descrição aqui apresentadas. Função muscular aumentada pode também ser medida, incluindo aumentos e melhorias na função muscular em torno 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%. O percentual de fibras musculares que expressam uma distrofina funcional pode também ser medido, incluindo expressão aumentada da distrofina em torno 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% de fibras musculares. Por exemplo, foi mostrado que em torno de 40% da melhoria da função muscular pode ocorrer se de 25 a 30% das fibras expressarem distrofina (ver, por exemplo, Dello-Russo *et al*, Proc Natl Acad Sci USA 99:12979-12984, 2002). Uma quantidade "aumentada" ou "melhorada" é tipicamente uma quantidade "estatisticamente significativa", e pode incluir um aumento que é de 1,1; 1,2; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 15; 20; 30; 40; 50 ou mais vezes (por exemplo, 500, 1000 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 composto não antisense (a ausência de um agente) ou um composto de controle.

[0088]O termo "redução" ou "bloqueado" pode referir geralmente a capacidade de um ou mais compostos antisensos da invenção para "diminuir" uma resposta relevante fisiológica ou celular, como um sintoma de uma doença ou condição aqui descrita, como medida de acordo com às técnicas de rotina na arte de diagnóstico. Relevante respostas fisiológicas ou celular (in vivo ou in vitro) será visível para pessoas versadas na técnica, e podem incluir reduções nos sintomas ou patologia da distrofia muscular, ou reduções na expressão de formas defeituosas de distrofina, como a alteração de formas de distrofina, que se manifestam nos indivíduos com DMD ou BMD. A "queda" de uma resposta pode ser estatisticamente significativa, em comparação com a resposta produzida por nenhum composto antisense ou uma composição de controle, e podem incluir um 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% de redução, incluindo todos os inteiros entre os dois.

[0089]"Homologia" se refere ao número percentual de aminoácidos, que são idênticos ou constituir substituições conservadoras. Homologia pode ser determinada através de programas de comparação de sequência, como GAP (Deveraux et al. 1984, pesquisa dos ácidos nucleicos 12, 387-395). Desta forma, as sequências de tamanho semelhante ou substancialmente diferentes dos aqui citados podem ser comparadas através da inserção de espaços para o alinhamento, as lacunas que serão determinadas, por exemplo, o algoritmo de comparação utilizado pela GAP.

[0090]As recitações "identidade de sequência", ou, por exemplo, compreendendo uma "sequência de 50% idêntica ao", como usado neste documento, referem-se à medida que as sequências são idênticas em uma base de nucleotídeos por nucleotídeo ou de aminoácido por aminoácido com base em uma janela de comparação. Assim, uma "percentagem de identidade de sequência" pode ser calculada através da comparação de duas sequências perfeitamente alinhada sobre a janela de comparação, a determinação do número de posições em que a base de ácido nucleico idêntico (por exemplo, A, T, C, G, I) ou o resíduo do ácido aminado idêntico (por exemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys e Met) ocorre em duas sequências para gerar o número de posições compensadas, dividindo o número de posições compensadas pelo número total de cargos na janela de comparação (ou seja, o tamanho da janela), e multiplicando o resultado por 100 para produzir o percentual de identidade da sequência.

[0091]Os termos usados para descrever as relações entre sequência de dois ou mais polipeptídeos ou polinucleotídeos incluem "sequência de referência", "janela de comparação", "identidade de sequência", "porcentagem de identidade de sequência" e "identidade substancial". A "sequência de referência" é pelo menos 8 ou 10,

mas frequentemente 15-18 e, muitas vezes, pelo menos, 25 unidades de monômero, incluindo nucleotídeos e aminoácidos, em comprimento. Porque cada dois polinucleotídeos pode incluir (1) uma sequência (ou seja, apenas uma parte da sequência de polinucleotídeo completa) que é semelhante entre os dois polinucleotídeos e (2) uma sequência que é divergente entre os dois polinucleotídeos, as comparações de sequência entre dois (ou mais) polinucleotídeos são normalmente realizadas por comparar as sequências dos dois polinucleotídeos sobre uma "janela de comparação" para identificar e comparar as regiões locais de similaridade de sequência. A "janela de comparação" refere-se a um segmento conceitual de pelo menos 6 posições contíguas, geralmente cerca de 50 a cerca de 100, mais geralmente cerca de 100 a cerca de 150 em que uma sequência é comparada a uma sequência de referência do mesmo número de posições contíguas após a duas sequências são perfeitamente alinhados. A janela de comparação pode incluir acréscimos ou supressões (ou seja, as lacunas) de cerca de 20% ou menos em comparação com a sequência de referência (que não incluem acréscimos ou supressões) para o alinhamento ideal das duas sequências. Ótimo alinhamento de sequências para alinhar uma janela de comparação pode ser efetuado por implementações de algoritmos computadorizados (GAP, BESTFIT, FASTA, e TFASTA no Wisconsin Genéticos Pacote de Software Versão 7.0, Computador Genética Grupo, 575 Ciência Drive Madison, WI, EUA) ou por inspeção e de o melhor alinhamento (ou seja, resultando na homologia maior percentual sobre a janela de comparação) gerados por qualquer um dos vários métodos selecionados. Referência também pode ser feita à família BLAST de programas como, por exemplo, divulgada pelo Altschul et al. 1997, Nucl. Ácidos Res.25:3389. Uma discussão detalhada sobre a análise da sequência pode ser encontrada em 19,3 Unidade de Ausubel et al. "Current Protocolos em Biologia Molecular", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, capítulo 15.

[0092]"Tratamento" ou "tratar" de um indivíduo (por exemplo, um mamífero,

como um ser humano) ou uma célula podem incluir qualquer tipo de intervenção utilizada na tentativa de alterar o curso natural do indivíduo ou célula. O tratamento inclui, mas não está limitado a, a administração de uma composição farmacêutica, e pode ser realizada tanto de forma profilática ou após o início de um evento patológico ou entre em contato com um agente etiológico. O tratamento inclui qualquer efeito desejável sobre os sintomas ou patologia de uma doença ou condição associada com a proteína distrofina, como em certas formas de distrofia muscular, e pode incluir, por exemplo, alterações mínimas ou melhorias em um ou mais marcadores mensuráveis da doença ou condição a ser tratada. Também estão incluídos os "profiláticos" tratamentos, que podem ser direcionadas à redução da taxa de progressão da doença ou patologia a ser tratada, atrasando o início da doença ou condição, ou reduzir a gravidade de seu início. "Tratamento" ou "profilaxia" não indicam, necessariamente, a erradicação completa, curar ou prevenir a doença ou condição, ou os sintomas associados da mesma.

[0093] Assim, estão incluídos os métodos de tratamento da distrofia muscular, como a DMD e BMD, pela administração de um ou mais oligômeros antisense da presente invenção (por exemplo, SEQ ID NOS: 1-569 e 612-635, e suas variantes), opcionalmente, como parte de uma formulação farmacêutica ou forma farmacêutica, a um sujeito que dela necessitam. Também estão incluídos os métodos de indução de exon-pulando em um assunto com a administração de um ou mais oligômeros antisense, em que o exon é um dos exons 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, e / ou 55 do gene da distrofina, preferencialmente o gene da distrofina humana. Um "sujeito", como aqui utilizado, inclui todos os animais que apresenta um sintoma, ou corre o risco de expor um sintoma, que pode ser tratada com um composto anti-sense da invenção, como um sujeito que tem ou está em risco de ter DMD ou BMD, ou qualquer um dos sintomas associados a essas condições (por exemplo, perda de fibras musculares). Temas adequados (doentes) incluem animais de laboratório (tais como o

rato, rato, coelho ou porquinho da Índia), animais e animais domésticos ou animais de estimação (como um cão ou gato). Os primatas não-humanos e, preferencialmente, os pacientes humanos, são incluídos.

[0094] Também estão incluídos os sistemas de vetores de entrega que são capazes de expressar as sequências oligoméricas distrofina-alvo da presente invenção, tais como vetores que expressam uma sequência de polinucleotídeos compreendendo uma ou mais das SEQ ID NOS: 1-569 e 612-635, ou suas variantes, como aqui descrito. Por "vetor" ou "ácido nucléico construído" se entende uma molécula de polinucleotídeo, preferencialmente uma molécula de DNA derivadas, por exemplo, de um plasmídeo, bacteriófagos, leveduras ou vírus, em que um polinucleotídeo podem ser inseridos ou clonada. Um vetor preferencialmente contém um ou mais sítios de restrição únicos e podem ser capazes de replicação autônoma em uma célula hospedeira definidos, incluindo uma célula de destino ou tecido ou uma célula progenitora ou tecido do mesmo, ou seja, integrável com o genoma do hospedeiro definido tal que o clonado sequência é reprodutível. Assim, o vetor pode ser um vetor de replicar de forma autônoma, ou seja, um vetor que existe como uma entidade extra-cromossômica, a replicação de que é independente da replicação cromossômica, como por exemplo, um plasmídeo linear ou circular fechada, um elemento extra-cromossômica, uma cromossomo mini-, ou um cromossomo artificial. O vetor pode conter todos os meios para garantir a auto-replicação. Alternativamente, o vetor pode ser aquela que, quando introduzido na célula hospedeira, é integrado no genoma e replicado em conjunto com o cromossomo (s) em que foi integrado.

[0095] Um sistema construído de vetor ou de ácido nucléico pode incluir um único vetor ou plasmídeo, dois ou mais vetores ou plasmídeos, que juntos contêm o DNA total a ser introduzidos no genoma da célula do hospedeiro, ou de um transposon. A escolha do vetor normalmente depende da compatibilidade entre o vetor com a célula hospedeira em que o vetor está a ser introduzido. No presente caso, o ácido

nucléico vetor ou construção é preferencialmente uma que é operavelmente funcional em uma célula de mamíferos, como uma célula muscular. O vetor pode também incluir um marcador de seleção, como um gene de resistência a antibióticos ou drogas, ou um gene repórter (ou seja, a proteína verde fluorescente, luciferase), que pode ser usado para a seleção ou identificação dos transformantes adequado ou transfectantes. Sistemas de entrega exemplar podem incluir sistemas de vetores virais (transdução, ou seja, viral mediada), incluindo, mas não limitado a, retroviral (por exemplo, lentiviral) vetores, vetores adenovirais, adeno-associados de vetores virais, herpes e vetores virais, entre outras conhecidas na técnica.

[0096]O termo "operavelmente ligado" como aqui utilizado, a colocação de uma sequência de codificação oligômero sob o controle de regulação de um promotor, que então controla a transcrição do oligômero.

[0097]Um gene do tipo selvagem ou produto do gene é o que é mais frequentemente observado na população e, portanto, arbitrariamente concebida sob a forma "normal" ou "selvagem" do gene.

[0098]"Alquil" ou "alquilenos" tanto se refere a um de hidrocarboneto saturado de cadeia linear ou ramificada radical contendo de 1 a 18 carbonos. Exemplos incluem, sem limitação de metila, etila, propila, iso-propila, butila, iso-butil, terc-butilico, n-pentila e n-hexila. O termo "alquila inferior" refere-se a um grupo alquila, tal como aqui definido, contendo entre 1 e 8 carbonos.

[0099]"Alquenila" se refere a uma cadeia de hidrocarbonetos insaturados em linha reta ou ramificada radical contendo 2-18 átomos de carbono e que compreende pelo menos uma ligação de carbono a carbono dupla. Exemplos incluem, sem limitação etenil, propenila, iso-propenil, butenil, iso-butenil, terc-butenil, n-pentenil e hexenil-n. O "alquenila inferior" se refere a um grupo alquenila, tal como aqui definido, contendo entre 2 e 8 carbonos.

[00100]"Alquinila" se refere a uma cadeia de hidrocarbonetos insaturados em

linha reta ou ramificada radical contendo 2-18 átomos de carbono, compreendendo pelo menos uma ligação carbono carbono para tripla. Exemplos incluem, sem limitação de etinil, propinilo, iso-propinilbutilo, butinil, iso-butinil, terc-butinil pentinil e hexinil. O "alquinila inferior" se refere a um grupo alquinila, como aqui definido, contendo entre 2 e 8 carbonos.

[00101]"Cicloalquila" se refere a uma alquila mono ou poli-cíclicos radicais. Exemplos incluem, sem limitação ciclobutil, ciclopentil, cicloexila, cicloheptil e ciclooctil.

[00102]"Aril" se refere a uma molécula de hidrocarboneto cíclico aromático contendo 5-18 átomos de carbono com um ou mais anel fechado (s). Exemplos incluem, sem limitação fenila, benzila, naftila, phenanthracenil, anthracenil e bifenilo.

[00103]"Aralquila" se refere a um radical da fórmula RRAE onde Ra é uma cadeia alquilenos como definida acima e Rb é um ou mais radicais arila como definido acima, por exemplo, benzila, diphenilmetil e afins.

[00104]"Tioalcoxi" refere-se a um radical da fórmula-SRC, onde Rc é um radical alquila como definido aqui. O "Tioalcoxi inferior" se refere a um grupo alcóxi, como aqui definido, contendo entre 1 e 8 carbonos.

[00105]"Alcoxi" se refere a um radical da fórmula-Orda onde Rd é um radical alquila como definido aqui. O "alcóxi inferior" refere-se a um grupo alcóxi, como aqui definido, contendo entre 1 e 8 carbonos. Exemplos de grupos alcóxi incluem sem limitação metóxi e etóxi.

[00106]"Alcoxialquil" se refere a um grupo alquila substituído com um grupo alcóxi.

[00107]"Carbonila" se refere ao radical -C(=O)-.

[00108]"Guanidinil" se refere ao radical $\text{H}_2\text{N}(\text{C}=\text{NH}_2)\text{-NH-}$.

[00109]"Amidinil" se refere ao radical $\text{-H}_2\text{N}(\text{C}=\text{NH}_2)\text{CH-}$.

[00110]"Amino" se refere ao radical -NH_2 .

[00111]"Alquilamino" se refere a um radical de fórmula -NHRd ou -NRdRd

onde cada Rd é, independentemente, um radical alquila como definido aqui. O termo "menor alquilamino" se refere a um grupo alquilamino, como aqui definido, contendo entre 1 e 8 carbonos.

[00112]"Heterociclo" significa monocíclico de 5 a 7 membros ou bicíclico de 7 a 10 membros, anel heterocíclico que é ou saturado, ou insaturado ou aromático, e que contém de 1-4 heteroátomos selecionados independentemente de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e onde o nitrogênio e o enxofre podem ser heteroátomos opcionalmente oxidados, e o heteroátomo nitrogênio opcionalmente pode ser quaternizado, incluindo anéis bicíclicos em que qualquer um dos heterociclos acima são fundidos a um anel de benzeno. O heterociclo pode ser acompanhado através de qualquer heteroátomo ou átomo de carbono. Heterociclos incluem heteroarils conforme definido abaixo. Assim, para além da heteroarils listados abaixo, heterociclos também incluir morfolinila, pirrolidinila, pirrolidinonil, piperidinila, piperizinil, hidantoinil, valerolactamil, oxiranil, oxetanil, tetraidrofuranil, tetraidropiranil, tetraidropiridinil, tetraidrothiophenil, tetraidrothiopiranil, tetraidropirimidinil tetraidrothiopiranil, e assim por diante.

[00113]"Heteroarila" significa um anel heterocíclico aromático de 5 a 10 membros, tendo pelo menos um heteroátomo selecionado de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e contendo pelo menos um átomo de carbono, incluindo os dois sistemas mono e anel bicíclico. Representante heteroarils são piridil, furil, benzofuranil, tiofenila, benzothiophenil, quinolinil, pirrolil, indolil, oxazolil, benzoxazolil, imidazólicos, benzimidazolil, tiazolil, benzothiazolil, isoxazolil, pirazolil, isothiazolil, piridazinil, pirimidinil, pirazinil, triazinil, cinnolinil phthalazinil, e quinazolinil.

[00114]Os termos "alquila opcionalmente substituído", "alquenila opcionalmente substituída", "alcóxi opcionalmente substituído", "opcionalmente substituído tioalcóxi", "opcionalmente substituído amino alquil", "opcionalmente substituído alquila inferior", "menor alquenila opcionalmente substituída", "opcionalmente substituído alcóxi inferior", "opcionalmente substituído menor tioalcóxi", "opcionalmente

substituída amino alquila inferior "e" heterociclila opcionalmente substituído "significa que, quando substituído, pelo menos um átomo de hidrogênio é substituído por um substituinte. No caso de um substituinte oxo (=O) dois átomos de hidrogênio são substituídos. A este respeito, substituintes incluem: o deutério, alquila opcionalmente substituído, alquenila opcionalmente substituída, alquinila opcionalmente substituído, aril opcionalmente substituído, heterociclo opcionalmente substituído, cicloalquila opcionalmente substituída, oxo, halogênio, -CN, -Orx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO₂Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)Orx, C(=O)NRxRy, SOmRx e -SOmNRxRy, onde m é 0, 1 ou 2, e Rx Ry são os mesmos ou diferentes e independentemente hidrogênio, alquila opcionalmente substituído, alquenila opcionalmente substituída, alquinila opcionalmente substituída, arila opcionalmente substituída, heterociclo opcionalmente substituído ou opcionalmente substituída cicloalquila e cada um disse alquila opcionalmente substituído, alquenila opcionalmente substituída, alquinila opcionalmente substituída, opcionalmente arila substituída, heterociclo opcionalmente substituído e, opcionalmente, substituintes substituída cicloalquila pode ser ainda substituído com um ou mais dos oxo, halogênio, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO₂Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOmRx e -SOmNRxRy.

Construindo Oligonucleotídeos antisensos

[00115]Exemplos de oligonucleotídeos morfolinos têm contido fósforo ligações de base são ilustrados nas Figs. 1A-1C. Especialmente preferido é um oligonucleotídeo morfolino fosforodiamidate ligadas como mostrado na figura 1C, que é modificada, de acordo com um aspecto da presente invenção, para conter os grupos carregados positivamente a preferência de 10% -50% das ligações a sua espinha dorsal. Oligonucleotídeos morfolino com ligações de base descarregadas e sua preparação, incluindo oligonucleotídeos antisenso, estão detalhadas, por exemplo, em (Summerton e Weller, 1997) e em co-propriedade Patentes dos EUA Nos 5698685, 5217866, 5142047, 5034506, 5166315, 5185, 444, 5521063 e 5506337, os quais são

expressamente incorporadas por referência neste documento.

[00116]As propriedades importantes das subunidades morfolinas baseadas incluem: 1) a capacidade de ser ligada em uma forma oligomérica por ligações de base estável, sem carga ou com carga positiva, 2) a capacidade de suportar uma base de nucleotídeos (por exemplo, adenina, guanina, citosina, timidina, uracil e inosina) tal que o polímero formado pode cruzar com um ácido meta-base nucléicos complementares, incluindo a RNA alvo, Tm valores acima de aproximadamente 45°C em oligonucleotídeos relativamente curto (por exemplo, 10-15 bases), 3) a capacidade do oligonucleotídeo para ser ativa ou passivamente transportada para as células de mamíferos e 4) a capacidade do oligonucleotídeo antisensos: RNA heteroduplex para resistir à degradação RNase e RNaseH, respectivamente.

[00117]Estruturas de base exemplificativas para oligonucleotídeos antisensos da matéria reivindicada inclui os tipos de subunidade morfolino mostrados nas Figs. 1D-G, cada uma ligada por um descarregada ou carregada positivamente, contendo fósforo ligação subunidade. Fig. 1D mostra uma ligação contendo fósforo que constitui a espinha dorsal cinco unidades de repetição átomo, caracterizado pelos anéis morfolinos estão ligados por uma articulação fosfoamido um átomo. Fig. 1E mostra um vínculo que produz um átomo de base de 6 unidades de repetição. Nesta estrutura, o Y átomo ligando as regiões 5' carbono morfolino ao grupo de fósforo pode ser de nitrogênio, enxofre, carbono ou, preferencialmente, de oxigênio. A fração X pendente de o fósforo pode ser de flúor, uma alquila ou alquila substituída, um alcóxi ou alcóxi substituído, um tioalcóxi ou substituídos tioalcóxi ou insubstituído, monossubstituído ou dissubstituídos nitrogênio, incluindo estruturas cíclicas, tais como morfolinas ou piperidinas. Alquil alcóxi, e preferencialmente, incluir tioalcóxi 1-6 átomos de carbono. As metades Z são enxofre ou oxigênio, e são preferencialmente de oxigênio.

[00118]As ligações mostradas nas Figs. 1F e 1G são projetados para base com unidade de comprimento de 7 átomos. Na estrutura 1F, a fração X é como na

estrutura 1E, e a fração Y pode ser de metileno, enxofre, ou, preferencialmente, o oxigênio. Na estrutura 1G, X e Y são metades como na estrutura 1E. Oligonucleotídeos morfolinos particularmente preferido incluem os compostos de estruturas morfolino de subunidade da forma mostrada na fig. 1E, onde $X = NH_2$, $N(CH_3)_2$, opcionalmente substituído piperazinil-1, ou um grupo acusado de outros, $Y=O$ e $Z=O$.

[00119]Como mencionado acima, o descarregado ou quase sem carga oligonucleotídeo pode ser modificado, de acordo com um aspecto da invenção, para incluir ligações cobradas, por exemplo, até cerca de 1 por cada 2-5 ligações sem carga, como cerca de 4-5 por cada 10 descarregados de ligações. Ótima melhoria na atividade antisensos pode ser vistos quando cerca de 25% das ligações de base são catiônicas, incluindo cerca de 20% para cerca de 30%. Também estão incluídos os oligômeros em que cerca de 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% (incluindo todos os inteiros entre eles), ou mais das ligações de base são catiônicas. Realce também é visto com um número pequeno, por exemplo, 5% e 10-20%, de ligações catiônicas.

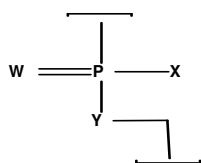
[00120]Uma base substancialmente descarregada contendo fósforo em um analógico oligonucleotídeo é normalmente aquele em que a maioria das ligações de subunidade, por exemplo, entre 50% -100%, normalmente, pelo menos, 60% a 100% ou 75% ou 80% dos seus vínculos, são descarregadas em pH fisiológico e contêm um único átomo de fósforo.

[00121]Experimentos adicionais realizados em apoio da presente invenção indicam que os aumentos vistos com adição de cargas catiônicas de base possam, em alguns casos, serem reforçadas através da distribuição da maioria das acusações perto da "região centro" ligações de base do oligonucleotídeo antisense, por exemplo, em um oligonucleotídeo 20mer com 8 conexões de base catiônica, tendo pelo menos 70% dessas ligações cobrados localizadas nos 10 laços mais central.

[00122]Os compostos antisensos podem ser preparados por síntese em fase sólida por etapas, empregando métodos descritos nas referências citadas acima, e

abaixo no que diz respeito à síntese de oligonucleotídeos tendo uma mistura de ligações de base sem carga e catiônicas. Em alguns casos, pode ser desejável para adicionar metades químicas adicionais para o composto anti-senso, por exemplo, para melhorar a farmacocinética ou para facilitar a captura ou a detecção do composto. Essa molécula pode ser covalentemente ligada, tipicamente para um terminal do oligômero, de acordo com a norma métodos sintéticos. Por exemplo, a adição de uma molécula de polietilenoglicol ou outro polímero hidrofílico, por exemplo, ter uma 10-100 subunidades monoméricas, pode ser útil no aumento da solubilidade. Um ou mais grupos carregados, por exemplo, grupos aniônicos cobrado como um ácido orgânico pode aumentar a absorção celular. Uma molécula de repórter, como a fluoresceína ou um grupo radiomarcado, podem ser associadas para fins de detecção. Alternativamente, o rótulo anexado ao repórter oligômero pode ser um ligante, como um antígeno ou biotina, capaz de ligar um anticorpo marcado ou estreptavidina. Na escolha de um agrupamento para a fixação ou modificação de um composto antisenso, em geral é naturalmente desejável para selecionar os compostos químicos de grupos que são biocompatíveis e susceptível de ser tolerado por um assunto sem efeitos colaterais indesejáveis.

[00123] Como mencionado acima, o composto antisenso pode ser construído para conter um número selecionado de ligações catiônicas intercalada com ligações descarregadas do tipo descrito acima. As ligações de intersubunidade, ambos descarregados e catiônicos, preferivelmente contendo fósforo são ligações, tendo a estrutura (II):



(II)

em que:

W é -S- ou -O-, e é preferivelmente -O-,

X = -NR¹R² ou -OR⁶,

Y = -O- ou -NR⁷, e

cada dita ligação no oligômero é selecionada a partir de:

(a) uma ligação descarregada (o), caracterizado cada um de R¹, R², R⁶ e R⁷ são independentemente selecionados de hidrogênio e alquila inferior;

(b1) uma ligação catiônica (b1), caracterizado X = NR¹R² e Y = -O- e -NR¹R² representa um radical piperazinil opcionalmente substituído, de modo que R¹R² = -CHRCHRN(R³)(R⁴)CHRCHR, onde:

cada R é independente H ou -CH₃,

R⁴ é H, -CH₃, ou um par de elétrons, e

R³ é selecionado de H, alquila inferior opcionalmente substituída, -C(=NH)NH₂, -Z-L-NHC(=NH)NH₂, e [-C(=O)CHR'NH]_mH, onde: Z é -C(=O)- ou uma ligação direta, L é um ligador opcional com até 18 átomos de comprimento, preferencialmente até 12 átomos, e mais, preferencialmente com até 8 átomos de comprimento, com títulos selecionados de alquila opcionalmente substituída, alcóxi opcionalmente substituído, e, opcionalmente substituído alquilamino, R' é uma cadeia lateral de um aminoácido que ocorre naturalmente ou um ou dois homólogo de carbono-o, e m é 1 a 6, preferencialmente, 1-4;

(b2) uma ligação catiônica (b2), onde X = -NR¹R² e Y = -O-, R¹ = H ou -CH₃, e R² = LNR³R⁴R⁵, em que L, R³ e R⁴ são como definidos acima, e R⁵ é H, alquila inferior opcionalmente substituída, ou alquila(alcóxi) inferior opcionalmente substituída; e

(b3) uma ligação catiônica (b3), em que Y = -NR⁷ e X = -OR⁶, e R⁷ = -LNR³R⁴R⁵, onde L, R³, R⁴ e R⁵ são como definidos acima, e R⁶ é H ou alquila inferior opcionalmente substituída; e

pelo menos uma dita ligação é selecionada a partir de ligações catiônicas (b1),

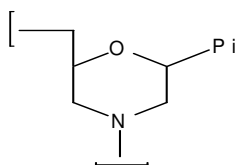
(b2) e (b3).

[00124] Preferencialmente, o oligômero inclui pelo menos duas ligações consecutivas do tipo (a) (ou seja, ligações descarregadas). Em modalidades adicionais, pelo menos, 5% das ligações no oligômero são ligações catiônicas (ou seja, tipo (b1), (b2) ou (b3)), por exemplo, 10% a 60%, e preferencialmente 20-50% de ligações podem ser ligações catiônicas.

[00125] Em uma modalidade, pelo menos uma ligação é do tipo de (b1), onde, preferencialmente, cada R é H, R4 é H, -CH3, ou um par de elétrons, e R3 é selecionado de H, alquila inferior opcionalmente substituída, -C(=NH)NH2 e -C(=O)NHC(=NH)NH2. As duas últimas modalidades de R3 fornecem uma porção de guanidina, quer ligados diretamente à piperazina, ou pendente a um grupo ligador L, respectivamente. Para facilitar a síntese, a variável Z, em R3 é preferivelmente -C(=O)-, como mostrado.

[00126] O grupo ligador L, como indicado acima, contém títulos em sua base selecionada alquila opcionalmente substituída, alcóxi opcionalmente substituído e, opcionalmente substituído alquilamino, caracterizado pelos átomos terminais em L (por exemplo, aquelas adjacentes às carbonila ou azoto) ser átomos de carbono. Embora as ligações ramificadas sejam possíveis, o vinculador é preferencialmente não ramificado. Em uma modalidade, o vinculador é um ligador alquílico linear. Tais vinculadores um pode ter a estrutura (CH2)-n, onde n é 1-12, preferencialmente, 2-8, e mais preferivelmente 2-6.

[00127] As subunidades morfólicas tem a seguinte estrutura (III):



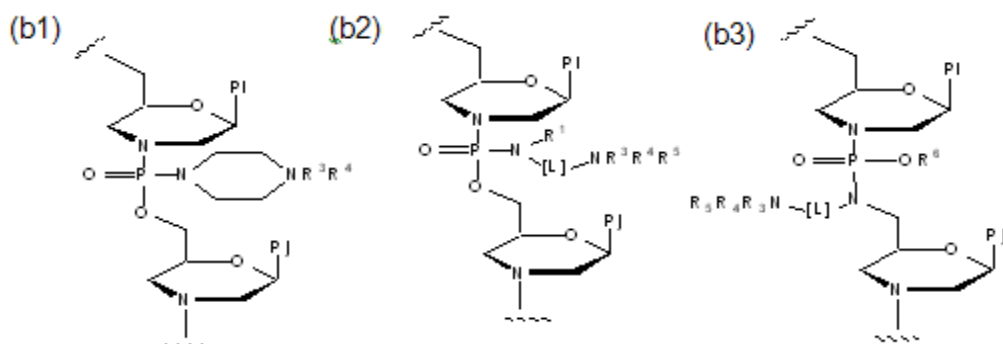
(III)

em que Pi é uma metade de pareamento de bases, e as ligações descritas

acima ligam o átomo de nitrogênio (III) aos carbono 5' de uma subunidade adjacente. As metades de pareamento de bases Pi podem ser as mesmas ou diferentes, e geralmente são projetados para fornecer uma sequência que se liga a um alvo de ácido nucléico.

[00128]O uso de modalidades de tipos de ligação (b1), (b2) e (b3) acima para ligar as subunidades morfolinas (III) pode ser ilustrado graficamente da seguinte forma:

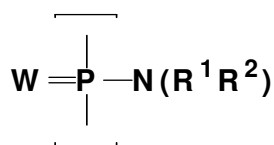
(b1)(b2)(b3)



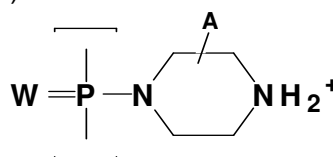
Preferencialmente, todas as ligações catiônicas no oligômero são do mesmo tipo, ou seja, todas do tipo (b1), todas do tipo (b2), ou todas do tipo (b3).

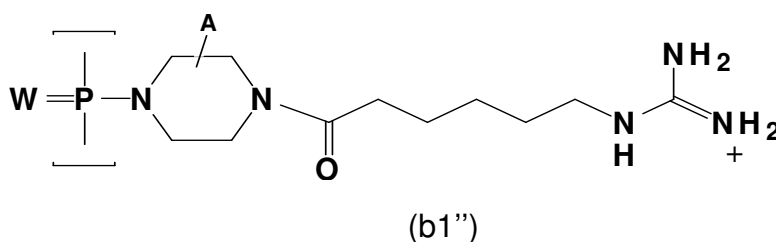
[00129]Em modalidades adicionais, as relações catiônicas são selecionadas a partir de ligações (b1') e (b1''), conforme mostrado abaixo, onde (b1') é aqui referida como uma ligação "Pip" e (b1'') é aqui referida como uma ligação "GuX":

(a)



(b1')





[00130] Nas estruturas acima, W é S ou O, e é preferivelmente O, cada um de R¹ e R² é independentemente selecionado de hidrogênio e, opcionalmente substituída com alquila inferior, preferencialmente metila, e A representa hidrogênio ou um substituinte não-interferência (ou seja, um substituinte que não prejudiquem a capacidade de um oligômero de vincular ao seu alvo) em um ou mais átomos de carbono (b1') e (b1''). Preferencialmente, os carbonos do anel no anel de piperazina são insubstituídos, no entanto, os carbonos do anel da piperazina podem incluir substituintes não-interferentes, tais como metil ou flúor. Preferencialmente, no máximo um ou dois átomos de carbono é tão substituídos.

[00131] Em modalidades adicionais, pelo menos 10% das ligações são do tipo (b1') ou (b1''), por exemplo, 10% -60% e, preferencialmente de 20% a 50%, as ligações podem ser do tipo de (b1') ou (b1'').

[00132] Em outras modalidades, o oligômero não contém ligações do tipo (b1') acima. Alternativamente, o oligômero não contém ligações do tipo (b1) onde cada R é H, R³ é H ou -CH₃, e R⁴ é H, -CH₃, ou um par de elétrons.

[00133] As subunidades morfolinas também podem ser ligadas por vínculos de intersubunidades não baseada em fósforo, como descrito mais abaixo, onde pelo menos uma ligação é modificada com um pingente do grupo catiônico como descrito acima.

[00134] Outras ligações analógicas de oligonucleotídeo que são descarregadas no seu estado inalterado, mas que também pode ter um pingente substituinte amina podem ser utilizados. Por exemplo, um átomo de nitrogênio 5' em um anel morfolino poderia ser empregado em uma ligação de sulfamida ou uma ligação de uréia

(onde o fósforo é substituído com carbono ou enxofre, respectivamente) e modificados de maneira análoga ao átomo de nitrogênio 5' na estrutura (b3) acima.

[00135]Oligômeros têm qualquer número de ligações catiônicas que são fornecidos, incluindo oligômeros totalmente catiônicas ligadas. Preferencialmente, no entanto, os oligômeros estão parcialmente carregados, tendo, por exemplo, 10% -80%. Em modalidades preferidas, cerca de 10% para 60%, e preferencialmente de 20% a 50% das ligações são catiônicas.

[00136]Em uma modalidade, as ligações catiônicas são intercaladas ao longo da espinha dorsal. Os oligômeros parcialmente carregados preferencialmente contêm pelo menos duas ligações consecutivas descarregadas, ou seja, o oligômero preferencialmente não tem um padrão estritamente alternado em toda sua extensão.

[00137]Também são considerados os oligômeros tendo blocos de ligações catiônicas e blocos de ligações descarregadas, por exemplo, um bloco central de ligações descarregadas pode ser ladeado por blocos de ligações catiônicas, ou vice-versa. Em uma modalidade, o oligômero tem aproximadamente de comprimento igual a 5', 3' e as regiões centro, bem como a percentagem de ligações catiônicas na região central é maior do que cerca de 50%, preferencialmente maior do que cerca de 70%.

[00138]Oligômeros para uso em aplicações antisensos geralmente variam em comprimento de cerca de 10 a cerca de 40 subunidades, mais preferivelmente aproximadamente 10 a 30 subunidades, e tipicamente 15-25 bases, incluindo aqueles que têm 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, bases 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ou 40. Em certas modalidades, um oligômero da invenção tem 19-20 subunidades, um comprimento útil de um composto antisenso, pode ter idealmente 2 a 10, por exemplo, 4 a 8, ligações catiônicas, e o restante de ligações descarregadas. Um oligômero com 14-15 subunidades pode, idealmente, ter 2 a 7, por exemplo, 3 a 5, ligações catiônicas, e o restante de ligações descarregadas.

[00139]Cada estrutura de anel morfolino suporta uma metade base de

emparelhamento, para formar uma sequência de metades de emparelhamento que normalmente é projetada para se hibridar a um alvo antisenso selecionado em uma célula ou em um indivíduo a ser tratado. O emparelhamento de base pode ser uma molécula de purina ou pirimidina encontrada no DNA ou RNA nativo (por exemplo, A, G, C, T ou U) ou um análogo, como hipoxantina (o componente de base do nucleosídeo inosina) ou citosina 5-metil .

Transportadores de Peptídeo

[00140] Os compostos antisensos da invenção podem incluir uma porção de oligonucleotídeos conjugados com uma molécula de arginina-rica de peptídeo de transporte eficaz para melhorar o transporte do composto nas células. A metade dos transportes é preferencialmente ligada a um terminal do oligômero, como mostra, por exemplo, nas Figuras 1B e 1C. A molécula de transporte de peptídeo, preferencialmente compreende 6-16 subunidades selecionados a partir de "subunidades, Y 'X subunidades, e subunidades Z',

em que:

(a) cada subunidade X independentemente representa arginina, lisina, ou um análogo de arginina, tais analógicos sendo um α -aminoácido catiônico compreendendo uma cadeia lateral da estrutura $R^1N=C(NH_2)R^2$, onde R^1 é H ou R; R^2 é R, NH_2 , NHR ou NR_2 , onde R é alquila inferior opcionalmente substituída ou alquenila inferior opcionalmente substituída; R^1 e R^2 podem se juntar para formar um anel; e a cadeia lateral está ligada ao dito aminoácido através de R^1 ou R^2 ;

(b) cada subunidade Y' independentemente representa um aminoácido neutro $-C(=O)(CHR)_n-NH-$, onde n é 2-7, e cada R é independentemente H ou metila; e

(c) cada subunidade Z' independentemente representa um α -aminoácido tendo uma cadeia lateral neutra aralquila;

em que o peptídeo compreendendo uma sequência representada por pelo menos um de $(X'Y'X)_p$, $(X'Y')_m$, e / ou $(X'Z'Z')_p$, onde p é de 2 a 5 e m é de 2 a 8. Certas

modalidades incluem várias combinações selecionadas de forma independente $(X'Y'X')_p$, $(X'Y')_m$, e / ou $(X'Z'Z')_p$, incluindo, por exemplo, peptídeos tendo a sequência $(X'Y'X')(X'Z'Z')(X'Y'X')(X'Z'Z')$ (SEQ ID NO: 637).

[00141]Em modalidades selecionadas, para cada X' , a metade da cadeia lateral é guanidil, assim como na subunidade arginina(Arg) do aminoácido. Em certas modalidades, cada Y' é independentemente $-C(=O)(CH_2)_n-CHR-NH-$, onde n é 2-7 e R é a H. Por exemplo, quando n é 5 e R é H, Y' é uma subunidade de ácido 6-amino-hexanóico, abreviado aqui como Ahx, quando n é 2 e R é H, Y' é uma subunidade β -alanina, abreviada aqui como B. Algumas modalidades se referem a peptídeos transportadores tendo uma combinação de diferentes aminoácidos neutros, incluindo, por exemplo, peptídeos compreendendo a sequência $-RahxRRBRRAhxRRBRAhxB-$ (SEQ ID NO: 578), que contém β -alanina e ácido 6-amino-hexanóico.

[00142]Peptídeos preferidos deste tipo incluem os dímeros compreendendo arginina alternando com subunidades Y' simples, onde Y' é preferencialmente Ahx ou B ou ambos. Exemplos incluem peptídeos tendo a fórmula $(RY'R)_p$ e / ou a fórmula $(RRY')_p$, onde p é 1 a 2 a 5 e em que Y' é, preferencialmente Ahx. Em uma modalidade, Y' é uma subunidade ácido 6-amino-hexanóico, R arginina e p é 4. Certas modalidades incluem várias combinações lineares de pelo menos dois de $(RY'R)_p$ e $(RRY')_p$, incluindo, por exemplo, peptídeos ilustrativos tendo a sequência $(RY'R)(RRY')$ $(RY'R)(RRY')$ (SEQ ID NO: 638), ou $(RRY')(RY'R)(RRY')$ (SEQ ID NO: 639). Outras combinações são contemplados. Em uma modalidade ainda mais ilustrativo, cada Z é fenilalanina, e m é 3 ou 4.

[00143]O peptídeo conjugado é, preferencialmente ligado a um terminal do oligômero através de um ligante Ahx-B, onde Ahx é uma subunidade ácido 6-amino-hexanóico e B é uma subunidade β -alanina, como mostra, por exemplo, nas Figs. 1B e 1C.

[00144]Em concretizações selecionadas, para cada X' , a metade da cadeia

lateral é independentemente selecionada do grupo consistindo de guanidil ($\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{NH}-$), amidinil ($\text{HN}=\text{C}(\text{NH}_2)\text{CH}-$), 2-aminodidropirimidil, 2-aminotetraidropirimidil, 2-aminopiridinil e 2-aminopirimidonil, e é preferencialmente selecionado guanidil e amidinil. Em uma modalidade, a metade da cadeia lateral é guanidil, assim como na subunidade arginina (Arg) do aminoácido.

[00145]Em certas modalidades, as subunidades Y' podem ser contíguas, em que nenhuma subunidade X' intervém entre subunidades Y' , ou intercaladas isoladamente entre subunidades X' . Em certas modalidades, a subunidade de ligação pode estar entre as subunidades Y' . Em uma modalidade, as subunidades Y' estão em um terminal do transportador, em outras modalidades, elas são acompanhadas por subunidades X' . Em outras modalidades preferidas, cada Y' é $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_n-\text{CHR}-\text{NH}-$, onde n é 2-7 e R é H. Por exemplo, quando n é 5 e R é H, Y' é uma subunidade ácido 6-aminohexanóico, abreviado aqui como Ahx. Em modalidades selecionadas deste grupo, cada X' compreende uma metade de cadeia lateral guanidil, como em uma subunidade arginina. Peptídeos preferidos deste tipo incluem os que constituem dímeros argininos alternando com subunidades Y' , onde Y' é preferencialmente Ahx. Exemplos incluem peptídeos tendo a fórmula $(\text{RY}'\text{R})_4$ ou a fórmula $(\text{RRY}')_4$, quando Y' é, preferencialmente, Ahx. Neste último caso, o análogo do ácido nucléico é preferencialmente ligado à subunidade terminal Y' , preferencialmente no C-terminal, como mostrado, por exemplo, nas Figs. 1B e 1C. O ligante preferido é o da estrutura AhxB, onde Ahx é uma subunidade ácido 6-aminohexanóico e B é uma subunidade β -alanina.

[00146]As metades de transporte, como descrito acima foram mostrados para aumentar consideravelmente a entrada de células de oligômeros em anexo, em relação à captação do oligômero na ausência da molécula de transporte de inscritos, e em relação à absorção por uma molécula de transporte de inscritos faltam as subunidades hidrofóbicas Y' . Essa é uma maior captação de preferência, evidenciada pelo

aumento de pelo menos duas vezes, e preferencialmente um aumento de quatro vezes, na absorção do composto em células de mamíferos em relação à captação do agente por um agrupamento de transporte ligado faltando as subunidades hidrofóbicas Y'. A absorção é preferencialmente reforçada com pelo menos vinte vezes, e preferencialmente mais de quarenta vezes, em relação ao composto não conjugado.

[00147]Um benefício adicional da metade da sua capacidade de transporte é esperado para estabilizar um duplex entre um composto antisenso e sua sequência alvo de ácido nucléico, presumivelmente em virtude da interação eletrostática entre a molécula de transporte de carga positiva e negativamente carregada de ácido nucléico. O número de subunidades cobrado no transportador é inferior a 14, como indicado acima, preferencialmente, entre 8 e 11, uma vez que um número demasiado elevado de subunidades acusado pode levar a uma redução da especificidade de sequência.

[00148]A utilização de transportadores de peptídeo ricos em arginina (por exemplo, a célula-penetrante de peptídeos) é particularmente útil na prática da presente invenção. Alguns transportadores de peptídeos têm demonstrado ser altamente eficazes na entrega de compostos antisensos em células primárias, incluindo células musculares (Marshall, Oda et al 2007;. Jearawiriyapaisarn, Moulton et al 2008;. Wu, Moulton et al 2008).. Além disso, comparado com outros transportadores de peptídeos como o peptídeo de Penetração e Tat, os transportadores de peptídeo aqui descritos, quando conjugado com um PMO antisensos, demonstram uma maior capacidade para alterar o “splicing” de transcrições de vários genes (Marshall, Oda et al. 2007). Especialmente preferidos são o P007 CP06062, e CP04057 transporte de peptídeos apresentados na Tabela 3 (SEQ ID NOS: 573, 578 e 577, respectivamente).

[00149]Exemplares transportadores de peptídeos, incluindo ligantes (B ou AhxB) são apresentados abaixo na Tabela B abaixo. Sequências preferidas são aquelas designadas por CP06062 (SEQ ID NO: 578), P007 (SEQ ID NO: 573) e CP04057

(SEQ ID NO: 577).

Tabela B. Exemplos Transportadores de Peptídeo para Entrega Intracelular de PMO

Peptídeo	Sequência (N-terminal a C-terminal)	SEQ ID NO:
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC	571
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxB	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	575
(RAhx) ₈ B	RahxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	576
(RAhxR) ₅ AhxB (CP05057)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxB	577
(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxB	578
MSP	ASSLNIA	579

Formulações

[00150]Em certas modalidades, a presente invenção fornece formulações ou composições apropriadas para a entrega terapêutica de oligômeros antisensos, como aqui descrito. Assim, em certas modalidades, a presente invenção fornece composições farmacologicamente aceitáveis que compreendem uma quantidade terapêuticamente eficaz de um ou mais dos oligômeros aqui descrito, formulada em conjunto com um ou mais transportadores farmacologicamente aceitáveis (aditivos) e / ou diluentes. Embora seja possível para um oligômero da presente invenção para ser administrado isoladamente, é preferível administrar o composto como uma formulação farmacêutica (composição).

[00151]Métodos para a entrega de moléculas de ácido nucléico são descritas, por exemplo, em Akhtar et al, 1992, Tendências Bio Cell, 2:139;.. E Estratégias para a Entrega de Oligonucleotídeos antisensos Terapêuticos, ed. Akhtar, Sullivan et al,

WO 94/02595 PCT.. Estes e outros protocolos podem ser utilizados para a entrega de praticamente qualquer molécula de ácido nucléico, incluindo os oligômeros isolados da presente invenção.

[00152]Conforme detalhado a seguir, as composições farmacêuticas da presente invenção podem ser especialmente formuladas para a administração no estado sólido ou líquido, incluindo aqueles adaptados para o seguinte: (1) a administração oral, por exemplo, encharca (soluções aquosas ou não-aquosas ou suspensões), comprimidas, por exemplo, aqueles voltados para a absorção oral, sublingual, e sistêmica, bolos, pós, grânulos, pastas para a aplicação na língua; (2) a administração parenteral, por exemplo, por injeção subcutânea, intramuscular, intravenosa ou peridural como, por exemplo, uma solução estéril ou suspensão, ou formulação de liberação sustentada, (3) a aplicação tópica, por exemplo, como um creme, pomada, ou um remendo de liberação controlada ou spray aplicado sobre a pele; (4) intravaginal ou retal, para exemplo, como um pessário, creme ou espuma; (5) por via sublingual (6); visualmente (7); transdérmica, ou por via nasal (8).

[00153]A frase "farmaceuticamente aceitável" é aqui utilizada para se referir a esses compostos, materiais, composições, e / ou formas farmacêuticas que são, no âmbito do julgamento médico de som, adequado para uso em contato com os tecidos dos seres humanos e animais, sem excessiva toxicidade, irritação, reações alérgicas, ou outro problema ou complicação, compatível com uma vantagem razoável / risco.

[00154]A expressão "transportador farmacêuticamente aceitável", usado aqui significa um material farmacêuticamente aceitável, composição ou do veículo, como um enchimento líquido ou sólido, diluente, excipiente, auxílios à indústria transformadora (por exemplo, lubrificantes, magnésio, talco, estearato de cálcio ou zinco, ou ácido estérico), ou material encapsulante solvente, envolvidos na execução ou transportar o sujeito composto de um órgão ou parte do corpo, para outro órgão ou parte do corpo. Cada transportador deve ser "aceitável" no sentido de ser compatível com

os outros ingredientes da formulação e não prejudicial ao paciente.

[00155]Alguns exemplos de materiais que podem servir como portadores farmacologicamente aceitáveis incluem, sem limitação: (1) açúcares, como glicose, lactose e sacarose; (2) amidos, como o amido de milho e fécula de batata, (3), celulose e seus derivados, tais como a celulose de sódio carboximetilcelulose, celulose, álcool etílico e acetato de celulose, (4) em pó tragacanth; (5) de malte, (6) gelatina (7); talco, (8) excipientes, tais como a manteiga de cacau e ceras supositório; (9) óleos, como óleo de amendoim, óleo de algodão, óleo de cártamo, óleo de gergelim, azeite de oliva, óleo de milho e óleo de soja; (10) glicóis, tais como propileno glicol, (11) polióis, como a glicerina, sorbitol, manitol e polietileno glicol (12); ésteres, tais como oleato de etila e laurato de etila, (13) agar; (14) agentes de tamponamento, como o hidróxido de magnésio e hidróxido de alumínio (15); ácido algínico (16); água fisiológica; (17) soro fisiológico; (18) de solução de Ringer; (19) álcool etílico; (20) pH de soluções tampão; (21) poliésteres, policarbonatos e / ou polianidridos, e (22) outras substâncias não-tóxicas compatível empregado em formulações farmacêuticas.

[00156]Exemplos adicionais, porém não limitantes, de agentes adequados para a formulação com os oligômeros antisensos da presente invenção incluem: PEG conjugados de ácidos nucleicos, fosfolípidos conjugados de ácidos nucleicos, ácidos nucleicos contendo fragmentos lipofílicos, fosforotioatos, P-glicoproteína inibidores (como Plurônico P85), que pode melhorar a entrada de drogas em vários tecidos, polímeros biodegradáveis, tais como poli (DL-ácido láctico co-glicólico) microesferas de liberação sustentada para entrega após o implante Alkermes, Inc (Emerich, DF et al, 1999, Células de Transplante, 8, 47-58). . Cambridge, Massachusetts, e nanopartículas, como aqueles feitos de polibutílcianoacrilato, que pode fornecer drogas através da barreira hemato-encefálica e podem alterar os mecanismos de captação neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

[00157]A invenção também caracteriza o uso da composição compreendendo

lipossomas com superfície modificada contendo poli (etileno glicol), lipídios (PEG-modificados, ramificado e não ramificado ou suas combinações, ou de longa circulação lipossomas ou lipossomas furtivos). Oligômeros da invenção pode também incluir moléculas covalentemente PEG de diferentes pesos moleculares. Estas formulações oferecem um método para aumentar a acumulação de drogas em tecidos alvo. Esta classe de drogas opsonização resiste a transportadoras e eliminação pelo sistema mononuclear fagocitário (SMF ou RES), permitindo assim maior tempo de circulação do sangue e exposição do tecido reforçado para a droga encapsulada (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627 ; Ishiwata et al, Pharm Chem Bull 1995, 43, 1005-1011)... Esses lipossomas têm sido mostrados para acumular seletivamente em tumores, presumivelmente pelo extravasamento e captação nos tecidos-alvo neovascularização (Lasic et al, Science 1995, 267, 1275-1276;.. Oku et al, 1995, Biochim Biophys Acta, 1238.. , 86-90). Os lipossomas de longa circulação melhoram a farmacocinética e farmacodinâmica de DNA e RNA, particularmente quando comparado ao convencional lipossomas catiônicos que são conhecidos por acumular nos tecidos do (MPS Liu et al. J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870 ;. Choi et al, Edição Internacional PCT No. WO 96/10391; Ansell et al, Edição Internacional PCT No. WO 96/10390;.. Holland et al, Edição Internacional PCT No. WO 96/10392). Longa circulação de lipossomas são também susceptíveis de proteger drogas da degradação nucleasa em maior medida em comparação com lipossomas catiônicos, com base na sua capacidade de evitar a acumulação em tecidos metabolicamente MPS agressivos, tais como o fígado e o baço.

[00158]Em uma modalidade adicional, a presente invenção inclui composições de oligômero preparados para entrega conforme descrito na Patente dos EUA N^o s 6692911, 7163695 e 7070807. Neste sentido, em uma modalidade, a presente invenção fornece um oligômero da presente invenção, em uma composição compreendendo copolímeros de lisina e histidina (HK), conforme descrito em Patentes dos

EUA 7.163.695, 7.070.807 e 6.692.911 isoladamente ou em combinação com PEG (por exemplo, , ramificados ou não ramificados PEG ou uma mistura de ambos), em combinação com PEG e uma porção alvo, ou qualquer dos anteriores, em combinação com um agente de reticulação. Em certas modalidades, a presente invenção proporciona oligômeros antisensos em composições compreendendo ácido glucônico-poli-histidina modificados ou gluconilated-poli-histidine/transferrin-polilisine. Um versado na técnica também reconhece que os aminoácidos com propriedades semelhantes aos seus e Lys pode ser substituído na composição.

[00159] Certas modalidades dos oligômeros descritos neste documento podem conter um grupo funcional básica, tais como aminoácidos ou alquilamino, e são, portanto, capazes de formar sais farmaceuticamente aceitáveis com ácidos farmaceuticamente aceitáveis. A expressão "sais farmaceuticamente aceitáveis" neste contexto, refere-se aos sais de ácido relativamente não-tóxico, orgânica e inorgânica adição de compostos da presente invenção. Esses sais podem ser preparados in situ no veículo de administração ou a dosagem do processo de produção, forma ou separadamente por reação de um composto purificado da invenção em sua forma de base livre com um ácido orgânico ou inorgânico adequado, e isolar o sal assim formado durante a purificação subsequente. Sais representativos incluem o bromidrato, cloridrato, sulfato, bissulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato de lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartarato, naptilate, mesilato, glucoheptonato, lactobionato e laurilsulfonate sais e coisas semelhantes. (Ver, por exemplo, Berge, et al. (1977) "Sais Farmacêutica", J. Pharm. Sci. 66:1-19).

[00160] Os sais farmaceuticamente aceitáveis dos oligômeros do assunto incluem os sais convencionais atóxicos ou sais quaternários de amônio de compostos, por exemplo, de não-tóxicos, ácidos orgânicos ou inorgânicos. Por exemplo, esses sais não tóxicos convencionais incluem os derivados de ácidos inorgânicos, como

cloridrato, bromídrico, ácido sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico, o gosto e os sais preparados a partir de ácidos orgânicos como o acético, propiônico, succínico, ácido glicólico, ácido esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, ácido palmítico, maléico, hidróximaleico, fenilacético, glutâmico, benzóico, salicílico, sulfanílico, 2-acetóxi-benzóico, fumárico, toluenosulfônico, dissulfônico etano metanossulfônico, oxálico, isotiônico, e assim por diante.

[00161]Em certas modalidades, os oligômeros da presente invenção podem conter um ou mais grupos funcionais ácidos e, portanto, são capazes de formar sais farmaceuticamente aceitáveis, com bases farmaceuticamente aceitável. A expressão "sais farmaceuticamente aceitável" nestes casos se refere à base de sais relativamente não-tóxica, orgânica e inorgânica adição de compostos da presente invenção. Esses sais podem também ser preparados in situ no veículo de administração ou a dosagem do processo de produção, forma ou separadamente por reagir o composto purificado na forma de ácido livre, com uma base adequada, como o hidróxido, carbonato ou bicarbonato de metal farmaceuticamente aceitável cação, com amônia ou com um farmaceuticamente aceitável amina orgânico primário, secundário ou terciário. Representante ou sais alcalinos terrosos incluem o lítio, sódio, potássio, cálcio, magnésio e sais de alumínio e similares. Representantes aminas orgânicas úteis para a formação de sais de adição de base incluem etilamina, dietilamina, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina e afins. (Ver, por exemplo, Berge et al. Supra).

[00162]Agentes umectantes, emulsificantes e lubrificantes, tais como o lauril sulfato de sódio e estearato de magnésio, assim como corantes, agentes desmoldantes, agentes de revestimento, edulcorantes, aromatizantes e perfumar, agentes conservantes e antioxidantes podem também estar presentes nas composições.

[00163]Exemplos de antioxidantes farmaceuticamente aceitáveis incluem: (1) água antioxidante solúvel, como o ácido ascórbico, cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo,

como palmitato de ascorbil, butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), lecitina, propil galato, alfa-tocoferol, e assim por diante, e (3) agentes quelantes de metal, como o ácido cítrico, ácido etilenodiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, fosfórico e assim por diante.

[00164]As formulações da presente invenção incluem aqueles adequados para oral, nasal, uso tópico (bucal e sublingual), administração rectal, vaginal e / ou parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e pode ser preparado por qualquer método conhecido na técnica da farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material de suporte para produzir uma forma de dosagem única vai variar dependendo do hospedeiro, sendo tratadas, o modo de administração. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinado com um material de suporte para produzir uma forma de dosagem única será geralmente essa quantidade do composto que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, esse valor irá variar de cerca de 0,1 por cento, para cerca de noventa e nove por cento do ingrediente ativo, preferencialmente de cerca de 5 por cento para cerca de 70 por cento, mais preferencialmente de cerca de 10 por cento para cerca de 30 por cento.

[00165]Em certas modalidades, a formulação da presente invenção compreende um excipiente selecionado ciclodextrinas, celulosas, lipossomas, formando micela agentes, por exemplo, ácidos biliares, e as transportadoras poliméricos, por exemplo, poliésteres e polianidridos, e um oligômero da presente invenção. Em certas modalidades, a formulação acima torna um oligômero oralmente biodisponível da presente invenção.

[00166]Métodos de preparação destas formulações ou composições incluem a etapa de trazer para associação de um oligômero da presente invenção com a transportadora e, opcionalmente, um ou mais ingredientes acessório. Em geral, as formulações são preparadas por uniforme e intimamente entrada em uma associação de

compostos da presente invenção com as transportadoras, líquido ou sólido finamente divididos as transportadoras, ou ambos, e, em seguida, se necessário, dar forma ao produto.

[00167]As formulações da invenção adequadas para a administração oral pode ser na forma de cápsulas, cápsulas para uso farmacêutico, comprimidos, tablets, pastilhas (usando uma base com sabor, geralmente sacarose e acácia ou traga-canto), pós, grânulos, ou como uma solução ou uma suspensão em um líquidos aquosos ou não aquosos, ou como um óleo-em-água ou água em óleo, emulsão líquida, ou como um elixir ou xarope, ou como pastilhas (usando uma base inerte, como a gelatina e glicerina, ou sacarose e acácias) e / ou como lava a boca e assim por diante, cada uma contendo uma quantidade predeterminada de um composto da presente invenção como um ingrediente ativo. Um oligômero da presente invenção também pode ser administrado como um bolus, electuário, ou pasta.

[00168]Em formas de dosagem sólidas da invenção para a administração oral (cápsulas, comprimidos, pílulas, drágeas, pós, grânulos, trouches e similares), o ingrediente ativo pode ser misturado com um ou mais transportadores farmaceuticamente aceitáveis, tais como o citrato de sódio ou bicálcico fosfato e / ou qualquer um dos seguintes: (1) enchimentos ou diluentes, tais como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol e ácido / ou sílicio, (2) aglomerantes, como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginato, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarose e / ou de acácia; (3) umectantes, como o glicerol, (4) os agentes se desintegrando, como o agar-agar, carbonato de cálcio, de batata ou amido de tapioca, o ácido algínico, silicatos certo, e carbonato de sódio; (5) agentes de solução de retardamento, tais como a parafina, (6) aceleradores de absorção, tais como compostos de amônio quaternário e surfactantes, tais como poloxamer lauril sulfato de sódio e (7); agentes umectantes, como, por exemplo, o monoestearato de álcool cetílico, glicerol e surfactantes não iônico, (8) absorventes, tais como argila de caulim e bentonita (9); lubrificantes, tais como o estearato de

cálcio, talco, estearato de magnésio, glicóis de polietileno sólido, lauril sulfato de sódio, estearato de zinco, o estearato de sódio, ácido esteárico , e suas misturas; (10) Corantes e (11) agentes de liberação controlada, como crospovidona ou etilcelulose. No caso das cápsulas, comprimidos e pílulas, a composições farmacêuticas podem também incluir agentes tamponantes. composições sólidas de um tipo semelhante também pode ser utilizada como preenchimento de moles e duros de casca de cápsulas gelatinosas com excipientes, tais como os açúcares lactose ou leite, bem como alta polietilenoglicóis de peso molecular e afins.

[00169]Um comprimido pode ser feito por moldagem por compressão ou, opcionalmente com um ou mais ingredientes acessório. Comprimido de comprimidos pode ser preparado usando um ligante (gelatina, por exemplo, ou hidroxipropilmetil celulose), lubrificante, solvente inerte, conservante, desintegrante (por exemplo, sódio, glicolato de amido ou carboximetilcelulose reticulada de sódio), agente de superfície ou de dispersão. Comprimidos moldados podem ser feitos por moldagem de uma máquina apropriada uma mistura do composto em pó humedecido com um diluente inerte em estado líquido.

[00170]Os comprimidos e outras formas farmacêuticas sólidas de composições farmacêuticas da presente invenção, tal como drágeas, cápsulas, comprimidos e granulados, opcionalmente podem ser marcados ou preparados com revestimentos e conchas, tais como revestimentos entéricos e outros revestimentos bem conhecida na indústria farmacêutica -formulação da técnica. Eles também podem ser formulados de modo a proporcionar liberação lenta ou controlada do ingrediente ativo nela usando, por exemplo, hidróxipropilmetil celulose em diferentes proporções para fornecer o perfil de liberação desejada, outras matrizes poliméricas, lipossomas e / ou microesferas. Eles podem ser formulados para a liberação rápida, por exemplo, liofilizadas. Eles podem ser esterilizados, por exemplo, filtração através de um filtro de retenção de bactérias, ou por incorporação de agentes esterilizantes na forma de

composições sólidas estéreis que pode ser dissolvido em água estéril, ou algum outro meio estéril injetável imediatamente antes do uso. Estas composições também podem conter, opcionalmente, agentes opacificantes e pode ser de uma composição que eles liberam o ingrediente ativo (s) apenas, ou preferencialmente, em uma determinada parte do trato gastrointestinal, opcionalmente, em uma forma atrasada. Exemplos de composições de incorporação, que podem ser usados incluem substâncias poliméricas e ceras. O ingrediente ativo também pode ser em forma de micro-encapsulado, se necessário, com um ou mais dos excipientes acima descritos.

[00171]Medicamentos líquidos para administração oral dos compostos da invenção incluem emulsões farmacêuticamente aceitável, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires. Além do ingrediente ativo, as formas farmacêuticas líquidas podem conter solventes inertes usados na técnica, como, por exemplo, água ou outros solventes, agentes de solubilização e emulsificantes, como o álcool etílico, álcool isopropílico, carbonato de etila, acetato de etila, álcool benzílico, benzoato de benzila, propileno glicol, 1,3-butileno glicol, óleos (em especial, caroço de algodão, amendoim, milho, mamona germe, azeite e óleos de gergelim), glicerol, álcool tetrahidrofúril, polietilenoglicóis e ésteres de ácidos graxos sorbitano e suas misturas.

[00172]Além de diluentes inertes, as composições orais também podem incluir adjuvantes, tais como agentes umectantes, emulsificantes e agentes de suspensão, edulcorantes, aromatizantes, corantes, conservantes e agentes perfumantes.

[00173]Suspensões, além de compostos ativos, que podem conter agentes de suspensão, como, por exemplo, álcoois etoxilados isoestearílico, sorbitol polioxietileno sorbitano e ésteres de celulose microcristalina, metahidróxido de alumínio, bentonita, ágar-ágar e tragacanto, e suas misturas.

[00174]Formulações para administração retal ou vaginal pode ser apresentada como um supositório, o que pode ser preparado por mistura de compostos de uma ou mais da invenção com um ou mais excipientes adequados não irritantes ou

portadores compreendendo, por exemplo, manteiga de cacau, polietilenoglicol, uma cera ou supositório um salicilato, e que é sólido à temperatura ambiente, mas o líquido na temperatura do corpo e, portanto, vai derreter no reto ou da cavidade vaginal e liberar o composto ativo.

[00175]Formulações e formas farmacêuticas para administração tópica ou transdérmica de um oligômero tal como se prevê incluir pós, sprays, pomadas, pastas, cremes, loções, géis, soluções, pastilhas e inalantes. Os oligômeros ativos podem ser misturados sob condições estéreis, com um transportador farmacêuticamente aceitável, e com conservantes, tampões, ou propulsores, que podem ser necessários. As pomadas, pastas, cremes e géis podem conter, além de um composto ativo da presente invenção, excipientes, tais como gorduras animais e vegetais, óleos, ceras, parafinas, amido, tragacanto, derivados de celulose, polietilenoglicóis, silicones, bentonitas, ácido silícico, talco e óxido de zinco, ou misturas dos mesmos.

[00176]Pós e sprays podem conter, além de um oligômero da presente invenção, excipientes, tais como lactose, talco, silício, hidróxido de alumínio, silicatos de cálcio e pó de poliamida, ou misturas destas substâncias. Sprays podem adicionalmente conter propelentes habituais, tais como clorofluorcarbonos e os hidrocarbonetos voláteis insubstituído, tais como butano e propano.

[00177]Pastilhas transdérmicas têm a vantagem adicional de fornecer liberação controlada de um oligômero da presente invenção para o corpo. Formas farmacêuticas podem ser feitas pela dissolução ou dispersão do oligômero no meio adequado. Promotores da absorção também podem ser usados para aumentar o fluxo do agente através da pele. A taxa de fluxo tal pode ser controlada por uma membrana oferecendo uma taxa de controle ou o agente de dispersão em uma matriz polimérica ou gel, entre outros métodos conhecidos na técnica.

[00178]Composições farmacêuticas adequadas para administração parenteral pode incluir um ou mais oligômeros da invenção em combinação com um ou mais

farmaceuticamente aceitável isotônica estéril de soluções aquosas ou não aquoso, dispersões, suspensões ou emulsões, ou pós estéreis, que pode ser reconstituído em soluções injetáveis estéreis ou dispersões pouco antes de usar, que podem conter açúcares, álcoois, antioxidantes, amortecedores, bacteriostates, solutos que tornam a formulação isotônica com o sangue do destinatário pretendido, ou suspender ou agentes espessantes. Exemplos de transportadores adequados aquosos e não aquosos que podem ser empregadas nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (como o glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e afins), e misturas adequadas do mesmo, óleos vegetais, tais como azeite, e injetáveis ésteres orgânicos, tais como oleato de etila. Fluidade adequada pode ser mantida, por exemplo, a utilização de materiais de revestimento, como a lecitina, pela manutenção do tamanho das partículas necessária no caso de dispersões, e pelo uso de surfactantes.

[00179]Estas composições também podem conter adjuvantes, tais como conservantes, umectantes, emulsionantes e dispersantes. Prevenção da ação dos microrganismos sobre os oligômeros assunto pode ser assegurada através da inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, ácido sórbico, fenol e assim por diante. Também pode ser desejável incluir agentes isotônicos, como açúcares, sódio, cloro e similares para as composições. Além disso, a absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser provocada pela inclusão de agentes que retardam a absorção, como monoestearato de alumínio e gelatina.

[00180]Em alguns casos, a fim de prolongar o efeito de uma droga, é desejável para diminuir a absorção do fármaco a partir da injeção subcutânea ou intramuscular. Isso pode ser conseguido através da utilização de uma suspensão líquida de material cristalino ou amorfo tendo solubilidade em água, entre outros métodos conhecidos na técnica. A taxa de absorção da droga, então depende da sua taxa de dissolução que, por sua vez, pode depender do tamanho do cristal e forma cristalina.

Alternativamente, absorção tardia de uma forma de droga parenteral administrada é realizada pela dissolução ou suspensão da droga em um veículo de petróleo.

[00181] Formas de depósito injetável podem ser feitos através da formação de matrizes microencapsuladas dos oligômeros assunto em polímeros biodegradáveis, como poliglicolídeo polilático. Dependendo da relação de oligômero de polímero e da natureza do polímero especial empregada, a taxa de liberação de oligômeros podem ser controlados. Exemplos de outros polímeros biodegradáveis incluem poli (ortoésteres) e poli (anidridos). Formulações de liberação lenta injetável também pode preparado pelo encapsulamento da droga em lipossomas ou microemulsões, que são compatíveis com os tecidos do corpo.

[00182] Quando os oligômeros da presente invenção são administrados como medicamentos, para os seres humanos e animais, que pode ser dada por si ou como uma composição farmacêutica contendo, por exemplo, 0,1 a 99% (mais preferivelmente, 10 a 30%) do ingrediente ativo em combinação com um veículo farmacêuticamente aceitável.

[00183] Como mencionado acima, as formulações ou preparações da presente invenção pode ser administrado por via oral, parenteral, tópica, ou retal. Eles normalmente são dadas em formas adequadas para cada via de administração. Por exemplo, eles são administrados em comprimidos ou cápsulas, através de injeção, inalação, colírio, pomada, supositório, etc administração por infusão de injeção ou inalação; tópica de pomada ou loção, e reto por supositórios.

[00184] As expressões "administração parenterais" e administrados por via parenteral", usado aqui significa modo de administração diferente da administração enteral e tópica, geralmente por injeção e inclui, sem limitação, por via intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticulare, subcapsular, injeção subaracnóide medular e intrasternal e infusão.

[00185]As expressões "administração sistêmica", "administrados por via sistêmica", "administração periférica" e "administrada perifericamente", usada aqui significa a administração de um composto de droga ou outro material que não seja diretamente no sistema nervoso central, de tal forma que ele entra no paciente sistema e, portanto, está sujeito ao metabolismo e outros processos como, por exemplo, a administração subcutânea.

[00186]Independentemente da via de administração selecionada, os oligômeros da presente invenção, que podem ser utilizados de forma adequada hidratação e / ou composições farmacêuticas da presente invenção podem ser formulados em formas farmacêuticas farmaceuticamente aceitável pelos métodos convencionais conhecidos pelos versados na técnica. Níveis de dosagem dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas desta invenção pode ser variado de modo a obter uma certa quantidade do ingrediente ativo que é eficaz para atingir a resposta terapêutica desejada para um determinado paciente, composição e modo de administração, sem inaceitavelmente tóxicos para o paciente.

[00187]O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do oligômero particular da presente invenção empregado ou éster de sal, ou amida do mesmo, a via de administração, o tempo de administração, a taxa de excreção ou metabolismo de o oligômero particular que está sendo utilizado, a taxa e a extensão da absorção, a duração do tratamento, outros medicamentos, compostos e / ou materiais utilizados em combinação com o oligômero particular empregados, a idade, sexo, peso, condição geral de saúde e médico prévio história do paciente a ser tratado, e fatores como o bem conhecido nas técnicas médicas.

[00188]Um médico ou veterinário sejam em comum versados na técnica pode facilmente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica necessária. Por exemplo, o médico ou veterinário poderia começar doses dos compostos da invenção empregados na composição farmacêutica em níveis mais baixos

do que o necessário para atingir o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dose até que o efeito desejado seja alcançado. Em geral, uma dose diária adequada de um composto da invenção será a quantidade do composto, que é a menor dose eficaz para produzir um efeito terapêutico. Essa dose eficaz geralmente depende de fatores acima descritos. Geralmente, as doses por via oral, intravenosa, subcutânea e intracerebroventricular dos compostos da presente invenção de um paciente, quando utilizados para os efeitos indicados, vão variar de cerca de 0,0001 a cerca de 100 mg por quilo de peso corporal por dia.

[00189]Se desejado, a dose diária eficaz do composto ativo pode ser administrado como dois, três, quatro, cinco, seis ou mais subdoses administradas separadamente em intervalos apropriados durante todo o dia, opcionalmente, em formas de dosagem unitária. Em determinadas situações, a administração é uma administração por dia. Em certas modalidades, a administração é administração de um ou mais por 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 o desejado expressão de uma proteína distrofina funcional.

[00190]Moléculas de ácido nucléico pode ser administrado a células por uma variedade de métodos conhecidos para quem está familiarizado com a técnica, incluindo mas não limitado a, o encapsulamento em lipossomas, por iontoforese, ou pela incorporação de outros veículos, tais como hidrogéis, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradáveis, e microesferas bioadesivo, como aqui descrito e conhecido na técnica. Em certas modalidades, a tecnologia microemulsificação pode ser utilizada para melhorar a biodisponibilidade de lipofílicos (insolúvel em água), produtos farmacêuticos. Exemplos incluem Trimetrine (Dordunoo, SK, et al, Desenvolvimento de Medicamentos e Farmácia Industrial, 17 (12) 1685-1713, 1991 e 5901 REV (Sheen, PC, et al, J Pharm Sci 80 (7), 712.. - 714, 1991). Entre outros benefícios, proporciona uma melhor biodisponibilidade microemulsificação por dirigir preferencialmente a absorção

no sistema linfático, em vez do sistema circulatório, que, assim, ignora o fígado e previne a destruição dos compostos na circulação hepatobiliar.

[00191]Em um aspecto da invenção, as formulações contêm micelas formadas a partir de um oligômero conforme previsto neste documento, e pelo menos um transportador anfifílicos, em que as micelas possuem um diâmetro médio de menos de cerca de 100 nm. Modalidades mais preferidas fornecem micelas com um diâmetro médio inferior a cerca de 50 nm e modalidades ainda mais preferidas fornecem micelas com um diâmetro médio inferior a cerca de 30 nm, ou até menos do que cerca de 20 nm.

[00192]Apesar de todas as transportadoras adequadas anfifílicas são contempladas, os portadores preferenciais atualmente são Geralmente Reconhecidos como Seguros (GRAS) status, e que tanto pode solubilizar os compostos da presente invenção e microemulsificar numa fase posterior, quando a solução entra em contato com uma fase aquosa complexa (como o encontrado no trato gastro-intestinal humano). Geralmente, os ingredientes anfifílicos que satisfaçam estes requisitos HLB (balanço lipofílico hidrofílico a) Os valores de 2-20, e suas estruturas contêm radicais alifáticos de cadeia linear na gama de C-6 a C-20. Exemplos são glicerídeos graxos polietileno glicolizado e glicóis de polietileno.

[00193]Exemplos de transportadores anfifílicos incluem saturados e monoinsaturados polietilenoglicolizado glicerídeos de ácidos graxos, tais como os obtidos total ou parcialmente hidrogenados óleos vegetais diversos. Tais óleos podem ser vantajosamente constituídos de tri-, di-, e glicerídeos de ácidos graxos mono-e di-e monoésteres de polietilenoglicol dos ácidos graxos correspondentes, com uma composição particularmente preferido de ácidos graxos, incluindo ácido cáprico 10/04, ácido cáprico 3 - 9 de ácido láurico 40-50, 14-24 ácido mirístico, ácido palmítico e ácido esteárico 4-14 5-15%. Outra classe muito útil de portadores anfifílicos inclui parcialmente esterificado sorbitano e / ou sorbitol, com saturados ou mono-insaturados (SPAN-

séries) ou correspondentes análogos etoxilados (Tween-série).

[00194]Comercialmente disponíveis transportadores anfifílicos podem ser particularmente úteis, incluindo Gelucire-série, Labrafil, Labrasol ou Lauroglycol (todos fabricados e distribuídos pela Gattefosse Corporation, Saint Priest, França), mono-PEG oleato, PEG-di-oleato, PEG-mono laurato-e di-laurato, lecitina, polisorbato 80, etc (produzidos e distribuídos por uma série de empresas nos EUA e no mundo inteiro).

[00195]Em certas modalidades, a entrega pode ocorrer através do uso de lipossomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas de lipídios, vesículas, e assim por diante, para a introdução das composições da presente invenção em células hospedeiras adequadas. Em particular, as composições da presente invenção podem ser formuladas para a entrega ou encapsulado em uma partícula de lipídios, um lipossoma, uma vesícula, um nanosphere, uma nanopartícula ou coisa parecida. A formulação e utilização de veículos de entrega como pode ser realizado através de técnicas conhecidas e convencionais. Polímeros hidrofílicos adequados para utilização na presente invenção são aqueles que são facilmente solúveis em água, podem ser covalentemente ligados a uma vesícula de lipídios, formando, e que são toleradas in vivo, sem efeitos tóxicos (ou seja, são biocompatíveis). Polímeros adequados incluem polietileno glicol (PEG), polilático (também denominado polilactida), ácido poliglicólico (também denominado poliglicolídeo), um copolímero de ácido polilático-poliglicólico e álcool polivinílico. Em certas modalidades, os polímeros têm um peso molecular 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 o polietilenoglicol com um peso molecular de cerca de 100 para cerca de 5000 daltons, ou tendo um peso molecular de cerca de 300 a cerca de 5.000 daltons. Em certas modalidades, o polímero é de 750 daltons polietilenoglicol (PEG (750)). Os polímeros podem também ser definidos pelo número de monômeros aí, uma

modalidade preferida da presente invenção utiliza polímeros de pelo menos cerca de três monômeros, polímeros, tais PEG constituído por três monômeros (aproximadamente 150 daltons).

[00196]Outros polímeros hidrofílicos que podem ser adequados para utilização na presente invenção incluem polivinilpirrolidona, polimetoxazoline, metacrilamida, polietiloxazoline polihidróxipropil, polimethacrilamide, polidimetilacrilamide e celulosos derivatizados como hidróximetilcelulose ou hidróxietilcelulose.

[00197]Em certas modalidades, a formulação da presente invenção compreende um polímero biocompatível selecionado do grupo consistindo de poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polipropileno, polímeros de ésteres acrílicos e metacrílicos, polímeros de polivinila, poliglicolides polissiloxanos, poliuretanos e co-polímeros dos mesmos, celulosos, polietilenos, o poliestireno, polímeros de ácido láctico e ácido glicólico, polianidridos, poli (orto) ésteres, (ácido butico) poli (ácido valérico) poli, poli (ácido láctico-co-caprolactona), polissacarídeos, proteínas, ácidos poliyalurônico, polianoacrilates e misturas, misturas, ou copolímeros dos mesmos.

[00198]Ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos, constituídos por 6, 7 ou 8 unidades de glicose, designado pela letra grega α , β ou γ , respectivamente. As unidades de glicose são ligadas por ligações α -1,4-glicosídicas. Como consequência da conformação cadeira das unidades de açúcar, todos os grupos hidróxilo secundário (em C-2, C-3) estão localizados em um lado do ringue, enquanto todos os principais grupos hidroxila 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, uma vez que são revestidas por átomos de hidrogênio de C-3 e C-5, e por oxigênios semelhantes ao éter. Essas matrizes permitem complexação com uma variedade de compostos relativamente hidrofóbica, incluindo, por exemplo, esteróides como a 17 α -estradiol (ver, por exemplo, van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). A complexação ocorre por

interações de van der Waals e por formação de ligação de hidrogênio. Para uma revisão geral da química de ciclodextrinas, ver, Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994).

[00199]As propriedades físico-químicas dos derivados de ciclodextrina dependem fortemente do tipo e do grau de substituição. Por exemplo, sua solubilidade em água varia de insolúveis (por exemplo, triacetil-ciclodextrina-beta) a 147% solúvel (p / v) (G-2-beta-ciclodextrina). Além disso, eles são solúveis em muitos solventes orgânicos. As propriedades das ciclodextrinas permitem que o controle sobre a solubilidade dos diversos componentes da formulação, aumentando ou diminuindo sua solubilidade.

[00200]Numerosas ciclodextrinas e seus métodos de preparação têm sido descritos. Por exemplo, Parmeter (I), et al. (EUA Pat. Nº 3453259) e Gramera, et al. (EUA Pat. No. 3459731) descreveu ciclodextrinas electroneutral. Outros derivados incluem ciclodextrinas com propriedades catiônicas [Parmeter (II), EUA Pat. Nº 3453257], insolúvel ciclodextrinas reticulado (Solms, EUA Pat. Nº3420788), e ciclodextrinas com propriedades aniônicas [Parmeter (III), EUA Pat. No. 3426011]. Entre os derivados de ciclodextrina com propriedades aniônicas, ácidos carboxílicos, fósforo, ácidos fosfínico, ácidos fosfônicos, ácidos fosfórico, ácido tiosfosfínico, ácidos ti-sulfínico e ácidos sulfônicos foram anexados ao pai ciclodextrina [ver, Parmeter (III), supra]. Além disso, os derivados de ciclodextrina sulfoalquila éter foram descritos por Stella, et al. (EUA Pat. Nº 5134127).

[00201]Lipossomas consistem em pelo menos uma membrana lipídica da bicamada, encerrando um compartimento aquoso interno. Os lipossomas podem ser caracterizados pelo tipo de membrana e pelo tamanho. Pequenas vesículas unilamelares (SUVs) têm uma única membrana e, normalmente, variam entre 0,02 e 0,05 µm de diâmetro; grandes vesículas unilamelares (LUVs) são geralmente maiores que 0,05 µm. Vesículas oligolamellar grande e vesículas multilamelares têm várias, geralmente

concêntricos, as camadas da membrana e são geralmente maiores que 0,1 microns. Lipossomas com várias membranas não concêntricas, ou seja, várias vesículas menores contidos dentro de uma grande vesícula são denominadas vesículas multivesiculares.

[00202]Um aspecto da presente invenção se refere a formulações compreendendo lipossomas contendo um oligômero da presente invenção, onde a membrana dos lipossomas é formulada para proporcionar um lipossoma com o aumento da capacidade de carga. Alternativamente ou em adição, o composto da presente invenção pode ser contido dentro ou adsorvido, a bicamada lipossomal dos lipossomas. Um oligômero da presente invenção pode ser agregado com um surfactante lipídico e realizado dentro do espaço interno do lipossoma é, nestes casos, a membrana dos lipossomas é formulado para resistir aos efeitos negativos do agregado agente ativo, surfactante.

[00203]De acordo com uma modalidade da presente invenção, a bicamada lipídica de lipossomas contém lipídios derivatizados com polietilenoglicol (PEG), de tal forma que as cadeias de PEG estendem a partir da superfície interna da bicamada lipídica no interior do espaço encapsulado pelos lipossomas, e estender a partir do exterior da bicamada lipídica para o meio circundante.

[00204]Agentes ativos contidos em lipossomas da presente invenção estão na forma solubilizada. Agregados de agente tensoativos e ativos (tais como emulsões ou micelas contendo o agente ativo de interesse) pode ser aprisionado dentro do espaço interior dos lipossomas de acordo com a presente invenção. A atua surfactante para dispersar e solubilizar o agente ativo, e poderão ser escolhidos a partir de qualquer surfactante apropriado alifáticos, cicloalifáticos ou aromáticos, incluindo, mas não limitado a lisofosfatidilcholines biocompatível (LPCs), com diferentes comprimentos de cadeia (por exemplo, de cerca de C14 para cerca de C20). Lipídios polímeros derivatizados como PEG-lipídios também podem ser utilizados para a formação de micelas

como eles vão agir para inibir a fusão / micela de membrana e, como a adição de um polímero de moléculas de surfactante diminui a CMC do surfactante e auxilia na formação de micelas. Preferidos são surfactantes com CMCs na faixa micromolar; surfactantes maiores CMC podem ser utilizados para preparar micelas enclausuradas em lipossomas da presente invenção.

[00205] Lipossomas de acordo com a presente invenção podem ser preparados por qualquer um de uma variedade de técnicas que são conhecidas no art. Ver, por exemplo, EUA Pat. N^o 4235871, aplicações Publicação PCT WO 96/14057, Nova RRC, Lipossomas: Uma abordagem prática, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104; Lasic DD, Lipossomas da física às aplicações, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Por exemplo, os lipossomas da presente invenção podem ser preparadas por difundir um lipídio derivatizado com um polímero hidrofílico em lipossomas pré-formados, tais como, expondo lipossomas pré-formados de micelas composto de lipídios-polímeros enxertados, em concentrações de lipídios correspondente à porcentagem final mol de derivatizados lipídicos que é desejado nos lipossomas. Lipossomas contendo um polímero hidrofílico também pode ser formado por homogeneização, hidratação campo de lipídios, ou técnicas de extrusão, como são conhecidas na técnica.

[00206] Em outro processo de formulação exemplar, o agente ativo é o primeiro disperso por sonicação em um ou outro lisofosfatidilcolina surfactante CMC baixa (incluindo os lipídeos polímero enxertado) que prontamente solubiliza moléculas hidrofóbicas. A suspensão micelar resultante de agente ativo é então usada para reidratar a amostra lipídica seca que contém um mol por cento adequados de lipídios-polímero enxertados ou colesterol. A suspensão do lipídio e do agente ativo é então formada em lipossomas usando técnicas de extrusão como são conhecidas na técnica, e os lipossomas resultantes separado da solução não encapsulada pela separação de coluna padrão.

[00207]Em um aspecto da presente invenção, os lipossomas são preparadas para terem tamanhos substancialmente homogêneos em uma faixa de tamanho selecionada. Um método de tamanho eficaz envolve extrusão de uma suspensão aquosa de lipossomas através de uma série de membranas de policarbonato tendo um tamanho de poro uniformizado; o tamanho de poro da membrana irá corresponder com os maiores tamanhos dos lipossomas produzidos por extrusão através da membrana (Ver, por exemplo, Patente Americana No, 4.737.323 de 12 de abril de 1998). Em certas modalidades, reagentes como DharmaFECT e Lipofectamine podem ser utilizados para introduzir polinucleotídeos ou proteínas nas células.

[00208]As características de uma formulação de liberação da presente invenção dependem do material encapsulante, a concentração de fármaco encapsulado, e na presença de modificadores de lançamento. Por exemplo, a liberação pode ser manipulado para ser dependente do pH, por exemplo, usando uma camada sensível ao pH, que libera apenas a um pH baixo, como no estômago ou um pH mais elevado, como no intestino. Um revestimento entérico pode ser usado para impedir que a liberação ocorra até após a passagem pelo estômago. Múltiplas camadas ou misturas de cianamida encapsulada em diferentes materiais podem ser usados para obter uma liberação inicial no estômago, seguido pelo lançamento no final do intestino. Lançamento também pode ser manipulado através da inclusão de sais ou formação de agentes de poros, o que pode aumentar a captação de água ou de liberação de droga por difusão a partir da cápsula. Excipientes que modificam a solubilidade da droga também pode ser usado para controlar a taxa de liberação. Agentes que aumentam a degradação da matriz ou da liberação da matriz também podem ser incorporados. Eles podem ser adicionados à droga, adicionada como uma fase separada (isto é, como partículas), ou pode ser co-dissolvidas na fase de polímero, dependendo do composto. Na maioria dos casos, o valor deve estar entre 0,1 e trinta por cento (p/p de polímero). Tipos de promotores de degradação incluem sais inorgânicos como

sulfato de amônio e cloreto de amônio, ácidos orgânicos como o ácido cítrico, ácido benzóico e ácido ascórbico, bases inorgânicos, como carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de cálcio, carbonato de zinco e hidróxido de zinco e bases orgânicas, como o sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina e trietanolamina e surfactantes como Tween® e Pluronic®. Pore formar agentes que aumentam a microestrutura das matrizes (ou seja, os compostos hidrossolúveis, tais como sais inorgânicos e açúcares) são adicionados como partículas. A gama é normalmente entre um e trinta por cento (p/p de polímero).

[00209]A absorção também pode ser manipulada alterando o tempo de permanência das partículas no intestino. Isto pode ser conseguido, por exemplo, pelo revestimento da partícula com, ou selecionar como material encapsulante, um polímero adesivo da mucosa. Exemplos incluem a maioria dos polímeros com grupos carboxila livres como a quitosana, celulose e, especialmente, poliacrilatos (como utilizado aqui, refere-se a polímeros poliacrilatos incluindo grupos acrilato e modificados, tais como grupos de acrilato de cianoacrilatos e metacrilatos).

[00210]Um oligômero pode ser formulado para ser contido, ou adaptado para lançamento de um dispositivo cirúrgico ou médico ou implante. Em certos aspectos, um implante pode ser revestido ou tratado com um oligômero. Por exemplo, hidrogéis, ou outros polímeros, tais como polímeros biocompatíveis e / ou biodegradáveis, pode ser usado para cobrir o implante com as composições da presente invenção (ou seja, a composição pode ser adaptada para uso com um dispositivo médico, utilizando um hidrogel ou de outro polímero). Polímeros e copolímeros de dispositivos médicos com revestimento de um agente são bem conhecidos na técnica. Exemplos de implantes incluem, mas não estão limitados a, stents, stents farmacológicos, suturas, próteses, cateteres vasculares, cateteres de diálise, enxertos vasculares, válvulas cardíacas protéticas, marcapassos, desfibriladores cardioversores implantáveis, agulhas IV, dispositivos de fixação do osso e formação, tais como pinos, parafusos, placas e outros

dispositivos e matrizes de tecido artificial para cicatrização de feridas.

[00211] Além dos métodos fornecidos aqui, os oligômeros para uso de acordo com a invenção podem ser formulada para a administração de qualquer forma conveniente para uso em medicina humana ou veterinária, por analogia com outros fármacos. Os oligômeros antisensos e suas formulações correspondentes podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outras estratégias terapêuticas no tratamento da distrofia muscular, como o transplante de mioblastos, terapias com células tronco, a administração de antibióticos aminoglicosídeos, inibidores de proteossomo, e as terapias-regulação (por exemplo, regulação ascendente de utrofina, um parálogo autossomal da distrofina).

[00212] Todas as publicações e pedidos de patentes citados nesta especificação estão aqui incorporados por referência, seja que cada uma das publicações individuais ou pedido de patente específica e individualmente foram indicados para serem incorporados por referência.

[00213] Embora a invenção anterior fosse descrita em detalhes por meio de ilustração e exemplo, para fins de clareza de entendimento, será facilmente perceptível para um especialista na arte da luz dos ensinamentos da presente invenção que determinadas alterações e modificações podem fazer-lhes, sem se afastar do espírito ou o alcance das reivindicações anexado. Os exemplos a seguir são fornecidos a título de ilustração, e não apenas por meio de limitação. Aqueles versados na técnica reconhecerão facilmente uma variedade de parâmetros não-críticos que poderiam ser alteradas ou modificadas para produzir resultados essencialmente similares.

Referências

Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Salto de Multiexon induzido antissenso para distrofia muscular de Duchenne faz mais sentido." *Am J Hum Genet* 74 (1): 83-92.

Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulação de "splicing" no gene

DMD por Oligorribonucleotídeos antisensos". Nucleosídeos e Nucleotídeos **16** (7-9): 1665-1668.

Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modificação de "splicing" no gene da distrofina em Células musculares cultivadas Mdx Oligorribonucleotídeos antisensos". Hum Mol Genet **7** (7): 1083-90.

Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Seleção de alvos para salto de exon oligonucleotídeo induzido antisenso no gene da distrofina." J Gene Med **5** (6): 518-27.

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustentada Expressão de Distrofina induzida por oligômeros morfolino peptídeo conjugados nos músculos de camundongos mdx." Mol Ther.

Lu, Q. L. C. J. Mann , et al. (2003). "Quantidades funcionais da distrofina produzidas por salto do exon mutado em camundongos distróficos mdx." Nat Med **9** (8): 1009-1014.

Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Salto de éxon induzido por oligonucleotídeo antisenso mehorado no modelo de camundongo mdx de distrofia muscular." J Gene Med **4** (6): 644-54.

Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Peptídeos ricos em arginina e penetrantes nas células facilitam a entrega de oligômeros antisenso em leucócitos murinos e "splicing" de alter pré-mRNA." Jornal de métodos imunológicos **325** (1-2): 114-126.

Matsuo, M., T. Masumura , et al. (1991). "Salto de exon durante o "splicing" de mRNA precursor da distrofina devido a um apagamento intraexon no gene da distrofina de kobe Duchenne distrofia muscular." J Clin Invest **87** (6): 2127-31.

Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "Uma explicação para as diferenças fenotípicas entre os pacientes portadores de deleções parciais do locus da DMD." Genomics **2** (1): 90-5.

Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Indução de salto de éxon da transcrição da distrofina nas células linfoblastóides por transfecção a um

oligodeóxinucleotídeo antisenso complementar a uma sequência de reconhecimento exon". Biochem Biophys Res Commun **226** (2): 445-9.

Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Emenda de oligômeros de comutação para os receptores da superfamília TNF e seu uso no tratamento da doença. PCT WO2007058894, Universidade da Carolina do Norte

Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Reparação de talassêmicos mRNA da beta-globina humana em células de mamíferos por oligonucleotídeos antisenso." Proc Acad nacional Sci USA **93** (23): 12840-4.

Summerton, J. e D. Weller (1997). "Oligômeros morfolino antisenso: Preparação, concepção e propriedades" Antisense Nucleic Acid Drug Dev **7** (3): 187-95.

Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulação do "splicing" in vitro do íntron montante por modificação de uma sequência do exon intra que é excluído do gene da distrofina em distrofina Kobe." J Clin Invest **95** (2): 515-20.

van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Salto de exon antisenso induzido restaura a expressão de distrofina em células musculares provenientes de pacientes com DMD." Hum Mol Genet **10** (15): 1547-54.

van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Restauração da distrofina local com oligonucleotídeo antisenso PRO051." N Engl J Med **357** (26): 2677-86.

Wilton, S. D., A.M. Fall, et al. (2007). "Salto de éxon oligonucleotídeo antisenso sobre a transcrição do gene da distrofina humana." Mol Ther **15** (7): 1288-96.

Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Remoção específica da mutação sem sentido do mRNA distrofina mdx utilizando oligonucleotídeos antisensos". Neuromuscul Disord **9** (5): 330-8.

Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Resgate efetivo da distrofina melhora a função cardíaca em ratos com deficiência de distrofina por um oligômero morfolino modificado." Proc Natl Acad Sci USA **105** (39): 14814-9.

Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Oligonucleotídeos antisenso de

peptídeos conjugados ce células penetrantes restauram o músculo sistêmico e expressão e função cardíaca da distrofina." Hum Mol Genet **17** (24): 3909-18.

EXEMPLOS

Materiais e Métodos

Células e Condições de Tratamento de Cultura de Tecidos

[00214]As células humanas Rabdomiossarcoma (ATCC, CCL-136; células RD) conservadas em uma solução de DMSO 5% (Sigma) em um número baixo de passagem foram descongeladas em banho-maria a 37 °C até a lasca de gelo já não era visível. As células foram semeadas em frascos de cultura de tecidos tratados com T75 (Nunc) de 1,5 x 10⁶ células / frasco em 24 mL de meio DMEM aquecido com L-Glutamina (HyClone), 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina-antibiótico estreptomicina (CelGro) , depois de 24 horas, a mídia foi aspirada, as células foram lavadas uma vez em PBS aquecido e novas mídias foi adicionado. As células foram cultivadas a 80% de confluência em uma incubadora a 37 °C a 5,0% de CO₂.

[00215]Mídia foi aspirada dos frascos T75, as células foram lavadas uma vez em PBS aquecido e aspirado. 3 mL de Tripsina / EDTA, aquecido em banho-maria a 37 °C, foi adicionado a cada T75. As células foram incubadas a 37 °C 5 2-5 minutos, até que, com agitação suave, eles lançaram a partir do balão. Suspensão celular foi transferida para um tubo cônico 15.0mL; frascos foram lavados com 1,0 ml de solução de tripsina / EDTA para coletar as células remanescentes. As células foram contadas com um contador de células Cell Vi-XR (Beckman Coulter). As células foram semeadas em cultura de tecidos tratados com placas de 12 poços (Falcon) em 2,0 x 10⁵ células viáveis por bem em 1,0 mL de mídia. As células foram incubadas durante a noite em uma incubadora a 37 °C a 5,0% de CO₂.

[00216]Doze placas-bem semeadas foram examinadas para a distribuição uniforme celular e aderência de placa. Peptídeo liofilizado conjugado fosforodiamidate oligômeros morfolino (PPMOs) foram ressuspensas em 2,0 em água livre de nuclease

(Ambion), e mantidos em gelo durante o tratamento de células, para verificar a molaridade, PPMOs foram medidos usando um espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Termo Científico). Imediatamente antes PPMO tratamento, a mídia foi aspirado e as células foram lavadas em PBS aquecido. PPMOs foram diluídos em meio aquecido para a molaridade desejada, as células foram tratadas em um total de 1,0 mL PPMO por poço. PPMOs foram testadas em triplicata. Para um tratamento não-controle, fresco, aquecido mídia foi adicionado em 1,0 mL de volume total. As células foram incubadas por 48 horas em incubadora a 37 °C a 5,0% de CO₂.

Extração de RNA

[00217]Mídia foi aspirada e as células foram lavadas em PBS aquecido. RNA foi extraído com o sistema QuickGene Mini80, QuickGene RNA de células cultivadas kit HC S, e MagNAlyser com homogeneização do grânulo de cerâmica utilizando os protocolos recomendados pelo fabricante. Resumidamente, as células foram lisadas em placas de tratamento com 350uL LRP (10ul β-mercaptoetanol adicionado por 100ul LRP) tampão de lise; homogenato foi gentilmente triturada para garantir a lise completa, e transferidas para tubos de MagNAlyser. Os tubos foram girados em 2800rpm durante 30 segundos no MagNAlyser para garantir a homogeneização completa, e momentaneamente congelado. 50uL tampão de solubilização SRP foi adicionado e homogeneizado foi centrifugado por 15 segundos. 170uL > 99% de etanol foi adicionado a cada tubo, e homogeneizado foi centrifugado por 60 segundos. Homogeneizado foi flash-fiado e transferidos para Mini80 cartuchos de RNA, as amostras foram pressurizadas e de fluxo foi descartada. Os cartuchos foram lavados em 750uL de tampão de lavagem WRP e pressurizado. 40uL de solução de DNase (1,25uL Qiagen DNaseI, 35uL RDD tampão, 3,75uL água livre de nuclease) foi adicionado diretamente à membrana do cartucho, cartuchos foram incubadas quatro minutos em temperatura ambiente. Os cartuchos foram lavados duas vezes com 750uL WRP, pressionando após cada lavagem. Os cartuchos foram colocados sobre os tubos nuclease

livre. 50uL tampão de eluição CRP foi adicionado a cada membrana, as membranas foram incubadas por cinco minutos em temperatura ambiente. Os cartuchos foram pressionados e eluato foi coletado. RNA foram armazenadas a -80 °C até quantificação. RNA foi quantificada através do Nanodrop TM 2000 espectrofotômetro.

Embutido RT-PCR

[00218]Amplificação otimizada embutida de RT-PCR primária específica, exon específico foi realizada utilizando os conjuntos de primários para cada exon da distrofina, conforme mostrado abaixo na Tabela 1.

Tabela 1. O par de primários foram utilizados de grupos de PCR que amplificam mRNA da distrofina humana para detectar exon-saltado.

Nome	F/R	I/O	Sequência (5'-3')	Exon	Finalidade	SEQ ID NO:
PS170	F	O	CCAGAGCTTTACCTGAGAAACA AG	48	Detecção do	640
PS172	F	I	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	49	Exon 50 e 51 Saltos em Distrofina Hu- mana	641
PS174	R	I	CGATCCGTAATGATTGTTCTAG CC	52		642
PS176	R	O	CATTTCAATTCAACTGTTGCCTCC G	53		643
PS186	F	O	CAATGCTCCTGACCTCTGTGC	42	Detecção do	644
PS187	F	I	GTCTACAACAAAGCTCAGGTCG	43	Exon 44 e 45 Saltos em Distrofina Hu- mana	645
PS189	F	I	GCAATGTTATCTGCTTCCTCCA ACC	46		646
PS190	R	O	GCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGG	46		647
PS192	F	O	CTTGGACAGAACTTACCGACTG G	51	Detecção do	648
PS193	F	I	GCAGGATTTGGAACAGAGGCG	52	Exon 53	649

PS195	R	I	CATCTACATTTGTCTGCCACTG G	54	Saltos em Distrofina Humana	650
PS197	R	O	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTC G	55		651

[00219] Os pares de primários indicados são mostrados para frente ou para trás (F / R) e pares de primários, quer externa ou interna (I / O) correspondente à amplificação primária ou secundária, respectivamente. A localização do alvo primário é indicada na coluna Exon e o Propósito indica que os eventos de salto de exon podem ser detectados. Por exemplo, primários PS170 e o PS176 amplificam uma região do exon 48-53 na amplificação primária. Primários PS172 e o PS174 então amplificam uma região do exon 49-52 na amplificação secundária. Esta reação embutida PCR detecta exon saltando de ambos os exons 50 e / ou exon 51. As condições específicas embutidas de reação de RT-PCR são fornecidas abaixo.

[00220] RNA extraído de células tratadas (descrito acima) foi diluído a 20ng/ul para todas as amostras.

Tabela 2: Configuração de reação para RT-PCR e amplificação primária (50 reação mL)

2x Mistura de Reação	25 µl
PS XXX Encaminhador Primário (30µM) (ver Tabela 1)	0,5 µl
PS XXX Primário Reversa (30µM) (ver Tabela 1)	0,5 µl
Sobrescrito III Platinum <i>Taq</i> mix	2 µl
Modelo RNA (20 ng/µL)	10 µl
Água Livre de Nuclease (50 µL total volume)	12 µl

Tabela 3: RT-PCR e amplificação primária do programa:

	Temperatura	Tempo	
Transcrição Reversa	55 °C	30 minutos	
RT Inativação	94 °C	2 minutos	
Desnaturação	94 °C	1 minuto	8 Ciclos

Recozimento	59 °C	1 minuto	
Extensão	68 °C	1 minuto	
	4 °C	∞	

Tabela 4: Reação de configuração para a amplificação secundária embutidas (Reação 50 µL):

10x PCR Tampão	5 µl
Solução dNTP (10mM)	0,5 µl
50 mM MgCl	1,5 µl
PS XXX Encaminhador Primário (30 µM) (ver Tabela 1)	0,33 µl
PS XXX Primário Reversa (30 µM) (ver Tabela 1)	0,33 µl
Polimerase Platinum <i>Taq</i> DNA	0,2 µl
0,1 mM Cy5-dCTP	1 µl
Produto RT-PCR (a partir do passo 1)	1 µl
Água livre de Nuclease (50 µL total volume)	40,15 µl

Tabela 5: Programa de amplificação secundária embutida:

	Temperatura	Tempo	28-30 Ciclos
Desnatura Primária	94 °C	3 minutos	
Desnaturação	94 °C	45 segundos	
Recozimento	59 °C	30 segundos	
Extensão	68 °C	1 minuto	
	4 °C	∞	

Gel análise de eletroforese

[00221]Dez microlitros de 5x corante Ficoll foi adicionado a cada microlitro 50 embutido de reação RT-PCR. Quinze microlitros de PCR / mistura de corante foi executado em um gel a 10% TBE a 300 volts por 30 minutos. Após a eletroforese, o gel foi lavado em diH₂O pelo menos uma hora, trocando a água a cada 30 minutos. O gel foi então digitalizado em um Trio Typhoon modo variável Imager (GE Saúde). Para exon 44 saltos, o produto embutido RT-PCR de longa-metragem transcrição da distrofina é 571 bp e 423 bp do Exon 44-pulado mRNA (exon 44 é de 148 pb). Para exon

45, o produto embutido RT-PCR de longa-metragem transcrição da distrofina é 571 pb e 395 pb do exon 45 saltado mRNA (exon 45 é 176 pb). Para exon 53, o produto da PCR de longa-metragem transcrição da distrofina é 365 pb e 153 pb do exon 53 saltado mRNA (exon 53 é 212 pb).

[00222]As imagens dos géis foram submetidas à análise quantitativa, medindo a intensidade da banda do produto da PCR de longa-metragem em comparação com o exon-saltado do produto. Em alguns casos, o percentual saltando em uma concentração PPMO fixo (por exemplo, 3 micromolar) foi utilizado para determinar a atividade relativa de uma série de PPMO para induzir exon saltando de um exon dado. Em outras situações, uma dose PPMO gama foi usada para tratar células (por exemplo, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 e 10 micromolar) e um EC50 foi calculado com base na porcentagem de salto induzido em cada concentração.

EXEMPLO 1

EXON 51 SCAN

[00223]Uma série de sobreposições PPMOs antisenso que têm como alvo o exon da distrofina humana 51 foi planejada, sintetizada e utilizada para tratar tanto as células rabdomiossarcoma humanas (células RD) ou células primárias do músculo esquelético humano. Esta estratégia é chamada de "exon scan" e foi usado de forma semelhante para vários exons da distrofina, conforme descrito abaixo. Todos os PPMOs foram sintetizados como peptídeos conjugados com PMO (PPMO), utilizando o peptídeo CP06062 (SEQ ID NO: 578) e 3 'de ligação PMO terminal. Para exon 51, uma série de 26 PPMOs, cada 26 bases de comprimento, foram feitas (SEQ ID NOS: 309-311, 314, 316, 317, 319, 321, 323, 324, 326, 327, 329-331, 333, 335, 336, 338-345), conforme mostrado na Figura 2A. O PPMOs foram avaliados quanto à eficácia do salto de éxon tratando células RD, em várias concentrações acima descrito nos Materiais e Métodos. Três PPMOs (SEQ ID NOS: 324, 326 e 327) foram identificados como eficazes na indução de exon-pular e selecionadas para avaliação adicional.

Experimentos de dose em células RD primária e células do músculo esquelético foram usados para confirmar a eficácia relativa destas três sequências PPMO. SEQ ID NO: 327 mostrou-se mais eficaz na indução exon 51 saltando como mostrado na Figura 2B e 2C.

[00224]Uma comparação entre a eficácia relativa de SEQ ID NO: 327 para outros exon 51-alvo sequências antisense foram realizadas em células RD primária e células do músculo esquelético, como descrito acima. Todas as sequências avaliadas foram feitas como PMOs peptídeo conjugado com o peptídeo CP06062 (SEQ ID NO: 578). Esta comparação permitiu direta da eficácia relativa das sequências antisense sem levar em conta a química antisense ou entrega celular. A localização relativa dos oligos exon 51-determinados orientados em comparação com SEQ ID NO: 327 é mostrado na Figura 2D. Conforme mostrado na Figura 2C existe uma hierarquia ordenada de eficácia exon-saltos, SEQ ID NO: 327 sendo o mais efetivo, pelo menos, um fator de várias vezes em comparação com outras sequências.

EXEMPLO 2

EXON 50 SCAN

[00225]Uma série de sobreposições PPMOs antisense que têm como alvo o exon da distrofina humana 50 foram planejados e sintetizados. Para exon 50, uma série de 17 PPMOs, cada 25 bases de comprimento, foram feitas (SEQ ID NOS: 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 280, 282 e 284-291), conforme mostrado na Figura 3A. O PPMOs foram avaliados quanto à eficácia salto de éxon tratando células RD, em várias concentrações acima descrito nos Materiais e Métodos. Quatro PPMOs (SEQ ID NOS: 277, 287, 290 e 291) foram identificados como eficazes na indução de exon-saltando e selecionadas para avaliação adicional. Experimentos de dose em células RD foram usados para confirmar a eficácia relativa destas quatro sequências de PMO. SEQ ID NOS: 584 (AVI-5656) e 287 (AVI-5038) se mostraram mais eficazes na indução do exon 50 saltando como mostrado na figura 3B. Os valores de EC50 foram

obtidos a partir dos experimentos com doses variadas e representam a concentração calculada em 50% do produto da PCR é a partir do mRNA falta relativa exon 50 para o produto da PCR produzido a partir do mRNA contendo o exon 50. Em comparação com outras sequências (ver, por exemplo, SEQ ID NOs: 584 e 585 correspondem a SEQ ID NOs: 173 e 175 em WO2006/000057, respectivamente), AVI-5038 (SEQ ID NO: 287) é equivalente ou melhor, induzindo exon- saltando atividade no ensaio de células RD, como mostrado na Figura 3B.

EXEMPLO 3

EXON 53 SCAN

[00226] Uma série de sobreposições PPMOs antisense que têm como alvo o exon da distrofina humana 53 foi planejada e sintetizada. Para exon 53, uma série de 24 PPMOs, cada 25 bases de comprimento, foram feitas (SEQ ID NOS: 416, 418, 420, 422, 424, 426, 428, 429, 431, 433, 434, 436, 438-440 e 443-451), conforme mostrado na Figura 4A. O PPMOs foram avaliados para salto de éxon eficácia ao tratar as células RD primária e células do músculo esquelético em várias concentrações acima descrito nos Materiais e Métodos. Três PPMOs (SEQ ID NOS: 428, 429 e 431) foram identificados como eficazes na indução de exon-saltando e selecionadas para avaliação adicional. experimentos de dose em células RD foram usados para confirmar a eficácia relativa destas três sequências PMO. SEQ ID NO: 429 mostrou-se mais eficaz na indução do exon 53 saltando como mostrado nas figuras F-4B. No entanto, quando comparado a outras sequências do exon 53 antisense, SEQ ID NO: 429 mostrou idêntica à H53A (23 47), que está listado como SEQ ID NO: 195 em WO2006/000057 e SEQ ID NO: 609 no presente pedido. Outras sequências foram comparadas com SEQ ID NO: 429, incluindo H53A (39 69) e H53A (-12 +10) (listado como SEQ ID NOs: 193 e 199 em WO2006/000057, respectivamente) e h53AON1 (listado como SEQ ID NO: 39 nos EUA Petição Nº 11/233, 507) e listado como SEQ ID NOs: 608, 611 e 610, respectivamente, no presente pedido. Todas as sequências

avaliadas foram feitas como PMOs peptídeo conjugado com o peptídeo CP06062 (SEQ ID NO: 578). Esta comparação permitiu direta da eficácia relativa das sequências antisense sem levar em conta a química antisense ou entrega celular. Conforme mostrado na Figura 4I e 4G-H, SEQ ID NO: 429 mostrou-se superior a cada um destes quatro sequências.

EXEMPLO 4

EXON 44 SCAN

[00227]Uma série de sobreposições PPMOs antisense que têm como alvo o exon da distrofina humana 44 foi planejada e sintetizada. Para exon 44, uma série de PPMOs, cada 25 bases de comprimento, foram feitas (SEQ ID NOS:1-20), como mostrado na Figura 5A. O PPMOs foram avaliados quanto à eficácia salto de éxon tratando células RD, em várias concentrações acima descrito nos Materiais e Métodos. Cinco PPMOs (SEQ ID NOS: 4, 8, 11, 12 e 13) foram identificados como eficazes na indução de exon-saltando e selecionadas para avaliação adicional. Experimentos de dose em células RD foram usados para confirmar a eficácia relativa destes cinco sequências PPMO como mostrado nas Figuras 5C às 5h. SEQ ID NOS: 8, 11 e 12 se mostraram mais eficazes na indução do exon 44 saltando como mostrado na Fig. 5H com SEQ ID NO: 12 provando o mais eficaz.

[00228]Comparação de SEQ ID NO: 12 a outras sequências do exon 44 antisense foi realizada em ambas as células RD humanos e células primárias de músculo esquelético. Todas as sequências avaliadas foram feitas como PMOs peptídeo conjugado com o peptídeo CP06062 (SEQ ID NO: 578). Esta comparação permitiu direta da eficácia relativa das sequências antisense sem levar em conta a química antisense ou entrega celular.

[00229]O alinhamento das sequências (SEQ ID NOS: 600, 601, 602 e 603) com SEQ ID NOS: 4, 8, 11 e 12 são mostrados na Figura 5B. SEQ ID NOS: 601 e 603 estão listados como SEQ ID NOS: 165 e 167 em WO2006/000057. SEQ ID NO: 602

estão listados na WO2004/083446 e como SEQ ID NO: 21 nos EUA Petição Nº 11/233, 507. SEQ ID NO: 600 foram publicadas em 2007 (Wilton Fall, et al 2007). A comparação em células RD mostrou que ambos os SEQ ID NOS: 602 e 603 foram superiores aos SEQ ID NO: 12 (Fig. 5i). No entanto, como mostrado na Figura 5J, em humanos em células primárias de músculo esquelético SEQ ID NO: 12 foi superior (8,86% exon saltar) para SEQ ID NO: 602 (6,42%). Experiências semelhantes são realizadas com SEQ ID NO: 603.

EXEMPLO 5

EXON 45 SCAN

[00230]Uma série de sobreposições PPMOs antisensos que têm como alvo o exon da distrofina humana 45 foi planejada e sintetizada. Para exon 45, uma série de 22 PPMOs, cada 25 bases de comprimento, foram feitas (SEQ ID NOS: 21, 23, 25, 27, 29, 31, 32, 34, 35, 37, 39, 41, 43 e 45 -53), conforme mostrado na Figura 6A. O PPMOs foram avaliados para salto de éxon eficácia ao tratar as células RD e humana em células primárias de músculo esquelético em várias concentrações acima descrito nos Materiais e Métodos. Cinco PPMOs (SEQ ID NOS: 27, 29, 34 e 39) foram identificados como eficazes na indução de exon-saltar e selecionadas para avaliação adicional. Experimentos de dose em células RD foram usados para confirmar a eficácia relativa destes PMO quatro sequências, conforme mostrado nas Figuras 6C-G e resumidos na Figura 6H. SEQ ID NO: 49 foram utilizados como controle negativo nesses experimentos. SEQ ID NOs: 29 e 34 se mostraram mais eficazes na indução do exon 45 saltando como mostrado na Fig. 6H.

[00231]Comparação de SEQ ID NO: 34 a outras sequências do exon 45 anti-senso foi realizada em ambas as células RD humanos e células primárias de músculo esquelético. Todas as sequências avaliadas foram feitas como PMOs peptídeo conjugado com o peptídeo CP06062 (SEQ ID NO: 578). Esta comparação permitiu direta da eficácia relativa das sequências antisenso sem levar em conta a química antisenso

ou entrega celular. O alinhamento das sequências (SEQ ID NOS: 604, 605, 606 e 607) com SEQ ID NOS: 27, 29, 34 e 39 são mostrados na Figura 6B. SEQ ID NOS: 604 e 607 estão listados como SEQ ID NOS: 211 e 207 em WO2006/000057, respectivamente. SEQ ID NOS: 605 e 606 são listadas nos EUA Petição N^o 11/233, 507 como SEQ ID NOS: 23 e 1, respectivamente. A comparação em células RD mostrou que SEQ ID NO: 34 foi superior a todas as quatro sequências avaliadas, como mostrado na Figura 6I. Os testes desses compostos em diferentes populações de células humanas primárias do músculo esquelético são realizados como descrito acima.

Sequência ID Cotação

[00232]As sequências são mostradas utilizando os símbolos comuns de bases de nucleotídeos do DNA: A, G, C e químicas antisenso T. Outras, como 2'-O-metil U usar no lugar do T. Qualquer uma das bases pode ser substituída com inosina (I) especialmente em trechos de três ou mais resíduos G.

<u>Nome</u>	<u>Sequências</u>	<u>SEQ ID NO.</u>
<u>Sequências-alvo Oligômero (5' para 3'):</u>		
Hu.DMD.Exon44.25.001	CTGCAGGTAAAAGCATATGGATCAA	1
Hu.DMD.Exon44.25.002	ATCGCCTGCAGGTAAAAGCATATGG	2
Hu.DMD.Exon44.25.003	GTCAAATCGCCTGCAGGTAAAAGCA	3
Hu.DMD.Exon44.25.004	GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA	4
Hu.DMD.Exon44.25.005	CAACAGATCTGTCAAATCGCCTGCA	5
Hu.DMD.Exon44.25.006	TTTCTCAACAGATCTGTCAAATCGC	6
Hu.DMD.Exon44.25.007	CCATTTCTCAACAGATCTGTCAAAT	7
Hu.DMD.Exon44.25.008	ATAATGAAAACGCCGCCATTTCTCA	8
Hu.DMD.Exon44.25.009	AAATATCTTTATATCATAATGAAAA	9
Hu.DMD.Exon44.25.010	TGTTAGCCACTGATTAAATATCTTT	10
Hu.DMD.Exon44.25.011	AAACTGTTGAGCTTCTGTTAGCCAC	11
Hu.DMD.Exon44.25.012	TTGTGTCTTTCTGAGAACTGTTCA	12

Hu.DMD.Exon44.25.013	CCAATTCTCAGGAATTTGTGTCTTT	13
Hu.DMD.Exon44.25.014	GTATTTAGCATGTTCCCAATTCTCA	14
Hu.DMD.Exon44.25.015	CTTAAGATAACCATTTGTATTTAGCA	15
Hu.DMD.Exon44.25.016	CTTACCTTAAGATAACCATTTGTATT	16
Hu.DMD.Exon44.25.017	AAAGACTTACCTTAAGATAACCATTT	17
Hu.DMD.Exon44.25.018	AAATCAAAGACTTACCTTAAGATAC	18
Hu.DMD.Exon44.25.019	AAAACAAATCAAAGACTTACCTTAA	19
Hu.DMD.Exon44.25.020	TCGAAAAAACAATCAAAGACTTAC	20
Hu.DMD.Exon45.25.001	CTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAAC	21
Hu.DMD.Exon45.25.002	CCTGTAAGATACCAAAAAGGCAAAA	22
Hu.DMD.Exon45.25.002. 2	AGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGGC	23
Hu.DMD.Exon45.25.003	GAGTTCCTGTAAGATACCAAAAAGG	24
Hu.DMD.Exon45.25.003. 2	CCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAAA	25
Hu.DMD.Exon45.25.004	TCCTGGAGTTCCTGTAAGATACCAA	26
Hu.DMD.Exon45.25.004. 2	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATA	27
Hu.DMD.Exon45.25.005	TGCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	28
Hu.DMD.Exon45.25.005. 2	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTA	29
Hu.DMD.Exon45.25.006	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGT	30
Hu.DMD.Exon45.25.006. 2	GCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	31
Hu.DMD.Exon45.25.007	CGCTGCCCAATGCCATCCTGGAGTT	32
Hu.DMD.Exon45.25.008	AACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA	33
Hu.DMD.Exon45.25.008. 2	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAA	34
Hu.DMD.Exon45.25.009	GTTGCATTCAATGTTCTGACAACAG	35
Hu.DMD.Exon45.25.010	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGC	36
Hu.DMD.Exon45.25.010.	ATTATTTCTTCCCCAGTTGCATTCA	37

2		
Hu.DMD.Exon45.25.011	GGCATCTGTTTTTGAGGATTGCTGA	38
Hu.DMD.Exon45.25.011.	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTT	39
2		
Hu.DMD.Exon45.25.012	AATTTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	40
Hu.DMD.Exon45.25.012.	ATACTGGCATCTGTTTTTGAGGATT	41
2		
Hu.DMD.Exon45.25.013	ACCGCAGATTCAGGCTTCCCAATTT	42
Hu.DMD.Exon45.25.013.	AATTTTTCCTGTAGAATACTGGCAT	43
2		
Hu.DMD.Exon45.25.014	CTGTTTGCAGACCTCCTGCCACCGC	44
Hu.DMD.Exon45.25.014.	AGATTCAGGCTTCCCAATTTTTCCT	45
2		
Hu.DMD.Exon45.25.015	CTCTTTTTTCTGTCTGACAGCTGTT	46
Hu.DMD.Exon45.25.015.	ACCTCCTGCCACCGCAGATTCAGGC	47
2		
Hu.DMD.Exon45.25.016	CCTACCTCTTTTTTCTGTCTGACAG	48
Hu.DMD.Exon45.25.016.	GACAGCTGTTTGCAGACCTCCTGCC	49
2		
Hu.DMD.Exon45.25.017	GTCGCCCTACCTCTTTTTTCTGTCT	50
Hu.DMD.Exon45.25.018	GATCTGTCGCCCTACCTCTTTTTTC	51
Hu.DMD.Exon45.25.019	TATTAGATCTGTCGCCCTACCTCTT	52
Hu.DMD.Exon45.25.020	ATTCCTATTAGATCTGTCGCCCTAC	53
Hu.DMD.Exon45.20.001	AGATACCAAAAAGGCAAAAC	54
Hu.DMD.Exon45.20.002	AAGATACCAAAAAGGCAAAA	55
Hu.DMD.Exon45.20.003	CCTGTAAGATACCAAAAAGG	56
Hu.DMD.Exon45.20.004	GAGTTCCTGTAAGATACCAA	57
Hu.DMD.Exon45.20.005	TCCTGGAGTTCCTGTAAGAT	58
Hu.DMD.Exon45.20.006	TGCCATCCTGGAGTTCCTGT	59
Hu.DMD.Exon45.20.007	CCCAATGCCATCCTGGAGTT	60
Hu.DMD.Exon45.20.008	CGCTGCCCAATGCCATCCTG	61

Hu.DMD.Exon45.20.009	CTGACAACAGTTTGCCGCTG	62
Hu.DMD.Exon45.20.010	GTTGCATTCAATGTTCTGAC	63
Hu.DMD.Exon45.20.011	ATTATTTCTTCCCCAGTTGC	64
Hu.DMD.Exon45.20.012	TTTGAGGATTGCTGAATTAT	65
Hu.DMD.Exon45.20.013	ATACTGGCATCTGTTTTTGA	66
Hu.DMD.Exon45.20.014	AATTTTTCTGTAGAATACT	67
Hu.DMD.Exon45.20.015	AGATTCAGGCTTCCCAATTT	68
Hu.DMD.Exon45.20.016	ACCTCCTGCCACCGCAGATT	69
Hu.DMD.Exon45.20.017	GACAGCTGTTTGCAGACCTC	70
Hu.DMD.Exon45.20.018	CTCTTTTTTCTGTCTGACAG	71
Hu.DMD.Exon45.20.019	CCTACCTCTTTTTTCTGTCT	72
Hu.DMD.Exon45.20.020	GTCGCCCTACCTCTTTTTTC	73
Hu.DMD.Exon45.20.021	GATCTGTGCGCCCTACCTCTT	74
Hu.DMD.Exon45.20.022	TATTAGATCTGTGCGCCCTAC	75
Hu.DMD.Exon45.20.023	ATTCCTATTAGATCTGTGCGC	76
Hu.DMD.Exon46.25.001	GGGGGATTTGAGAAAATAAAATTAC	77
Hu.DMD.Exon46.25.002	ATTTGAGAAAATAAAATTACCTTGA	78
Hu.DMD.Exon46.25.002. 2	CTAGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAA	79
Hu.DMD.Exon46.25.003	AGAAAATAAAATTACCTTGACTTGC	80
Hu.DMD.Exon46.25.003. 2	TTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAA	81
Hu.DMD.Exon46.25.004	ATAAAATTACCTTGACTTGCTCAAG	82
Hu.DMD.Exon46.25.004. 2	TTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAG	83
Hu.DMD.Exon46.25.005	ATTACCTTGACTTGCTCAAGCTTTT	84
Hu.DMD.Exon46.25.005. 2	TATTCTTTTGTTCTTCTAGCCTGGA	85
Hu.DMD.Exon46.25.006	CTTGACTTGCTCAAGCTTTTCTTTT	86
Hu.DMD.Exon46.25.006. 2	CAAGATATTCTTTTGTTCTTCTAGC	87

Hu.DMD.Exon46.25.007	CTTTTAGTTGCTGCTCTTTTCCAGG	88
Hu.DMD.Exon46.25.008	CCAGGTTCAAGTGGGATACTAGCAA	89
Hu.DMD.Exon46.25.008. 2	ATCTCTTTGAAATTCTGACAAGATA	90
Hu.DMD.Exon46.25.009	AGCAATGTTATCTGCTTCCTCCAAC	91
Hu.DMD.Exon46.25.009. 2	AACAAATTCATTTAAATCTCTTTGA	92
Hu.DMD.Exon46.25.010	CCAACCATAAAACAAATTCATTTAA	93
Hu.DMD.Exon46.25.010. 2	TTCCTCCAACCATAAAACAAATTCA	94
Hu.DMD.Exon46.25.011	TTTAAATCTCTTTGAAATTCTGACA	95
Hu.DMD.Exon46.25.012	TGACAAGATATTCTTTTGTTCTTCT	96
Hu.DMD.Exon46.25.012. 2	TTCAAGTGGGATACTAGCAATGTTA	97
Hu.DMD.Exon46.25.013	AGATATTCTTTTGTTCTTCTAGCCT	98
Hu.DMD.Exon46.25.013. 2	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAAGTGGG	99
Hu.DMD.Exon46.25.014	TTCTTTTGTTCTTCTAGCCTGGAGA	100
Hu.DMD.Exon46.25.014. 2	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCTCTTTT	101
Hu.DMD.Exon46.25.015	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	102
Hu.DMD.Exon46.25.016	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAAGAATA	103
Hu.DMD.Exon46.25.017	AGCCTGGAGAAAGAAGAATAAAATT	104
Hu.DMD.Exon46.25.018	CTGGAGAAAGAAGAATAAAATTGTT	105
Hu.DMD.Exon46.20.001	GAAAGAAGAATAAAATTGTT	106
Hu.DMD.Exon46.20.002	GGAGAAAGAAGAATAAAATT	107
Hu.DMD.Exon46.20.003	AGCCTGGAGAAAGAAGAATA	108
Hu.DMD.Exon46.20.004	CTTCTAGCCTGGAGAAAGAA	109
Hu.DMD.Exon46.20.005	TTGTTCTTCTAGCCTGGAGA	110
Hu.DMD.Exon46.20.006	TTCTTTTGTTCTTCTAGCCT	111
Hu.DMD.Exon46.20.007	TGACAAGATATTCTTTTGTT	112

Hu.DMD.Exon46.20.008	ATCTCTTTGAAATTCTGACA	113
Hu.DMD.Exon46.20.009	AACAAATTCATTTAAATCTC	114
Hu.DMD.Exon46.20.010	TTCCTCCAACCATAAAACAA	115
Hu.DMD.Exon46.20.011	AGCAATGTTATCTGCTTCCT	116
Hu.DMD.Exon46.20.012	TTCAAGTGGGATACTAGCAA	117
Hu.DMD.Exon46.20.013	CTGCTCTTTTCCAGGTTCAA	118
Hu.DMD.Exon46.20.014	CTTTTCTTTTAGTTGCTGCT	119
Hu.DMD.Exon46.20.015	CTTGACTTGCTCAAGCTTTT	120
Hu.DMD.Exon46.20.016	ATTACCTTGACTTGCTCAAG	121
Hu.DMD.Exon46.20.017	ATAAAATTACCTTGACTTGC	122
Hu.DMD.Exon46.20.018	AGAAAATAAAATTACCTTGA	123
Hu.DMD.Exon46.20.019	ATTTGAGAAAATAAAATTAC	124
Hu.DMD.Exon46.20.020	GGGGGATTTGAGAAAATAAA	125
Hu.DMD.Exon47.25.001	CTGAAACAGACAAATGCAACAACGT	126
Hu.DMD.Exon47.25.002	AGTAACTGAAACAGACAAATGCAAC	127
Hu.DMD.Exon47.25.003	CCACCAGTAACTGAAACAGACAAAT	128
Hu.DMD.Exon47.25.004	CTCTTCCACCAGTAACTGAAACAGA	129
Hu.DMD.Exon47.25.005	GGCAACTCTTCCACCAGTAACTGAA	130
Hu.DMD.Exon47.25.006	GCAGGGGCAACTCTTCCACCAGTAA	131
Hu.DMD.Exon47.25.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTTCCACC	132
Hu.DMD.Exon47.25.008	TTTAATTGTTTGAGAATTCCCTGGC	133
Hu.DMD.Exon47.25.008. 2	TTGTTTGAGAATTCCCTGGCGCAGG	134
Hu.DMD.Exon47.25.009	GCACGGGTCCTCCAGTTTCATTTAA	135
Hu.DMD.Exon47.25.009. 2	TCCAGTTTCATTTAATTGTTTGAGA	136
Hu.DMD.Exon47.25.010	GCTTATGGGAGCACTTACAAGCACG	137
Hu.DMD.Exon47.25.010. 2	TACAAGCACGGGTCCTCCAGTTTCA	138
Hu.DMD.Exon47.25.011	AGTTTATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	139
Hu.DMD.Exon47.25.012	TCTGCTTGAGCTTATTTTCAAGTTT	140

Hu.DMD.Exon47.25.012. 2	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTATGGGA	141
Hu.DMD.Exon47.25.013	CTTTATCCACTGGAGATTTGTCTGC	142
Hu.DMD.Exon47.25.013. 2	CTTATTTTCAAGTTTATCTTGCTCT	143
Hu.DMD.Exon47.25.014	CTAACCTTTATCCACTGGAGATTTG	144
Hu.DMD.Exon47.25.014. 2	ATTTGTCTGCTTGAGCTTATTTTCA	145
Hu.DMD.Exon47.25.015	AATGTCTAACCTTTATCCACTGGAG	146
Hu.DMD.Exon47.25.016	TGGTTAATGTCTAACCTTTATCCAC	147
Hu.DMD.Exon47.25.017	AGAGATGGTTAATGTCTAACCTTTA	148
Hu.DMD.Exon47.25.018	ACGGAAGAGATGGTTAATGTCTAAC	149
Hu.DMD.Exon47.20.001	ACAGACAAATGCAACAACGT	150
Hu.DMD.Exon47.20.002	CTGAAACAGACAAATGCAAC	151
Hu.DMD.Exon47.20.003	AGTAACTGAAACAGACAAAT	152
Hu.DMD.Exon47.20.004	CCACCAGTAACTGAAACAGA	153
Hu.DMD.Exon47.20.005	CTCTTCCACCAGTAACTGAA	154
Hu.DMD.Exon47.20.006	GGCAACTCTTCCACCAGTAA	155
Hu.DMD.Exon47.20.007	CTGGCGCAGGGGCAACTCTT	156
Hu.DMD.Exon47.20.008	TTGTTTGAGAATTCCCTGGC	157
Hu.DMD.Exon47.20.009	TCCAGTTTCATTTAATTGTT	158
Hu.DMD.Exon47.20.010	TACAAGCACGGGTCCTCCAG	159
Hu.DMD.Exon47.20.011	GCTTATGGGAGCACTTACAA	160
Hu.DMD.Exon47.20.012	ATCTTGCTCTTCTGGGCTTA	161
Hu.DMD.Exon47.20.013	CTTATTTTCAAGTTTATCTT	162
Hu.DMD.Exon47.20.014	ATTTGTCTGCTTGAGCTTAT	163
Hu.DMD.Exon47.20.015	CTTTATCCACTGGAGATTTG	164
Hu.DMD.Exon47.20.016	CTAACCTTTATCCACTGGAG	165
Hu.DMD.Exon47.20.017	AATGTCTAACCTTTATCCAC	166
Hu.DMD.Exon47.20.018	TGGTTAATGTCTAACCTTTA	167
Hu.DMD.Exon47.20.019	AGAGATGGTTAATGTCTAAC	168

Hu.DMD.Exon47.20.020	ACGGAAGAGATGGTTAATGT	169
Hu.DMD.Exon48.25.001	CTGAAAGGAAAATACATTTTAAAAA	170
Hu.DMD.Exon48.25.002	CCTGAAAGGAAAATACATTTTAAAA	171
Hu.DMD.Exon48.25.002. 2	GAAACCTGAAAGGAAAATACATTTT	172
Hu.DMD.Exon48.25.003	GGAAACCTGAAAGGAAAATACATTT	173
Hu.DMD.Exon48.25.003. 2	CTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATAC	174
Hu.DMD.Exon48.25.004	GCTCTGGAAACCTGAAAGGAAAATA	175
Hu.DMD.Exon48.25.004. 2	TAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGAA	634
Hu.DMD.Exon48.25.005	GTAAAGCTCTGGAAACCTGAAAGGA	176
Hu.DMD.Exon48.25.005. 2	TCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGAA	177
Hu.DMD.Exon48.25.006	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAACCTGA	178
Hu.DMD.Exon48.25.006. 2	GTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAAC	179
Hu.DMD.Exon48.25.007	TGTTTCTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	180
Hu.DMD.Exon48.25.007. 2	AATTTCTCCTTGTTTCTCAGGTAAA	181
Hu.DMD.Exon48.25.008	TTTGAGCTTCAATTTCTCCTTGTTT	182
Hu.DMD.Exon48.25.008	TTTTATTTGAGCTTCAATTTCTCCT	183
Hu.DMD.Exon48.25.009	AAGCTGCCCAAGGTCTTTTATTTGA	184
Hu.DMD.Exon48.25.010	AGGTCTTCAAGCTTTTTTTTCAAGCT	185
Hu.DMD.Exon48.25.010. 2	TTCAAGCTTTTTTTTCAAGCTGCCCA	186
Hu.DMD.Exon48.25.011	GATGATTAACTGCTCTTCAAGGTC	187
Hu.DMD.Exon48.25.011. 2	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAAGCTTT	188
Hu.DMD.Exon48.25.012	AGGAGATAACCACAGCAGCAGATGA	189
Hu.DMD.Exon48.25.012.	CAGCAGATGATTAACTGCTCTTCA	190

2		
Hu.DMD.Exon48.25.013	ATTTCCAAGTATTCTAATAGGAG	191
Hu.DMD.Exon48.25.014	CTTGGTTTGGTTGGTTATAAATTTC	192
Hu.DMD.Exon48.25.014.	CAACTGATTCTAATAGGAGATAAC	193
2		
Hu.DMD.Exon48.25.015	CTTAACGTCAAATGGTCCTTCTTGG	194
Hu.DMD.Exon48.25.015.	TTGGTTATAAATTTCCAAGTATTCT	195
2		
Hu.DMD.Exon48.25.016	CCTACCTTAACGTCAAATGGTCCTT	196
Hu.DMD.Exon48.25.016.	TCCTTCTTGGTTTGGTTGGTTATAA	197
2		
Hu.DMD.Exon48.25.017	AGTTCCTACCTTAACGTCAAATGG	198
Hu.DMD.Exon48.25.018	CAAAAAGTTCCCTACCTTAACGTCA	199
Hu.DMD.Exon48.25.019	TAAAGCAAAAAGTTCCCTACCTTAA	200
Hu.DMD.Exon48.25.020	ATATTTAAAGCAAAAAGTTCCCTAC	201
Hu.DMD.Exon48.20.001	AGGAAAATACATTTTAAAAA	202
Hu.DMD.Exon48.20.002	AAGGAAAATACATTTTAAAAA	203
Hu.DMD.Exon48.20.003	CCTGAAAGGAAAATACATTT	204
Hu.DMD.Exon48.20.004	GGAAACCTGAAAGGAAAATA	205
Hu.DMD.Exon48.20.005	GCTCTGGAAACCTGAAAGGA	206
Hu.DMD.Exon48.20.006	GTAAAGCTCTGGAAACCTGA	207
Hu.DMD.Exon48.20.007	CTCAGGTAAAGCTCTGGAAA	208
Hu.DMD.Exon48.20.008	AATTTCTCCTTGTTTCTCAG	209
Hu.DMD.Exon48.20.009	TTTTATTTGAGCTTCAATTT	210
Hu.DMD.Exon48.20.010	AAGCTGCCCAAGGTCTTTTA	211
Hu.DMD.Exon48.20.011	TTCAAGCTTTTTTTTCAAGCT	212
Hu.DMD.Exon48.20.012	CTGCTCTTCAAGGTCTTCAA	213
Hu.DMD.Exon48.20.013	CAGCAGATGATTTAACTGCT	214
Hu.DMD.Exon48.20.014	AGGAGATAACCACAGCAGCA	215
Hu.DMD.Exon48.20.015	CAACTGATTCTAATAGGAG	216
Hu.DMD.Exon48.20.016	TTGGTTATAAATTTCCAAGT	217

Hu.DMD.Exon48.20.017	TCCTTCTTGGTTTGGTTGGT	218
Hu.DMD.Exon48.20.018	CTTAACGTCAAATGGTCCTT	219
Hu.DMD.Exon48.20.019	CCTACCTTAACGTCAAATGG	220
Hu.DMD.Exon48.20.020	AGTTCCCTACCTTAACGTCA	221
Hu.DMD.Exon48.20.021	CAAAAAGTTCCCTACCTTAA	222
Hu.DMD.Exon48.20.022	TAAAGCAAAAAGTTCCCTAC	223
Hu.DMD.Exon48.20.023	ATATTTAAAGCAAAAAGTTC	224
Hu.DMD.Exon49.25.001	CTGGGGAAAAGAACCCATATAGTGC	225
Hu.DMD.Exon49.25.002	TCCTGGGGAAAAGAACCCATATAGT	226
Hu.DMD.Exon49.25.002. 2	GTTTCCTGGGGAAAAGAACCCATAT	227
Hu.DMD.Exon49.25.003	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAACCCAT	228
Hu.DMD.Exon49.25.003. 2	TTTCAGTTTCCTGGGGAAAAGAACC	229
Hu.DMD.Exon49.25.004	TATTTTCAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	230
Hu.DMD.Exon49.25.004. 2	TGCTATTTTCAGTTTCCTGGGGAAAA	231
Hu.DMD.Exon49.25.005	ACTGCTATTTTCAGTTTCCTGGGGAA	232
Hu.DMD.Exon49.25.005. 2	TGAACTGCTATTTTCAGTTTCCTGGG	233
Hu.DMD.Exon49.25.006	CTTGAACTGCTATTTTCAGTTTCCTG	234
Hu.DMD.Exon49.25.006. 2	TAGCTTGAACTGCTATTTTCAGTTTC	235
Hu.DMD.Exon49.25.007	TTTAGCTTGAACTGCTATTTTCAGTT	236
Hu.DMD.Exon49.25.008	TTCCACATCCGGTTGTTTAGCTTGA	237
Hu.DMD.Exon49.25.009	TGCCCTTTAGACAAAATCTCTTCCA	238
Hu.DMD.Exon49.25.009. 2	TTTAGACAAAATCTCTTCCACATCC	239
Hu.DMD.Exon49.25.010	GTTTTTCCTTGTACAAATGCTGCCC	240
Hu.DMD.Exon49.25.010. 2	GTACAAATGCTGCCCTTTAGACAAA	241

Hu.DMD.Exon49.25.011	CTTCACTGGCTGAGTGGCTGGTTTT	242
Hu.DMD.Exon49.25.011. 2	GGCTGGTTTTTCCTTGTACAAATGC	243
Hu.DMD.Exon49.25.012	ATTACCTTCACTGGCTGAGTGGCTG	244
Hu.DMD.Exon49.25.013	GCTTCATTACCTTCACTGGCTGAGT	245
Hu.DMD.Exon49.25.014	AGGTTGCTTCATTACCTTCACTGGC	246
Hu.DMD.Exon49.25.015	GCTAGAGGTTGCTTCATTACCTTCA	247
Hu.DMD.Exon49.25.016	ATATTGCTAGAGGTTGCTTCATTAC	248
Hu.DMD.Exon49.20.001	GAAAAGAACCCATATAGTGC	249
Hu.DMD.Exon49.20.002	GGGAAAAGAACCCATATAGT	250
Hu.DMD.Exon49.20.003	TCCTGGGGAAAAGAACCCAT	251
Hu.DMD.Exon49.20.004	CAGTTTCCTGGGGAAAAGAA	252
Hu.DMD.Exon49.20.005	TATTTTCAGTTTCCTGGGGAA	253
Hu.DMD.Exon49.20.006	ACTGCTATTTTCAGTTTCCTG	254
Hu.DMD.Exon49.20.007	CTTGAAGTCTATTTTCAGTT	255
Hu.DMD.Exon49.20.008	TTTAGCTTGAAGTCTATTT	256
Hu.DMD.Exon49.20.009	TTCCACATCCGGTTGTTTAG	257
Hu.DMD.Exon49.20.010	TTTAGACAAAATCTCTTCCA	258
Hu.DMD.Exon49.20.011	GTACAAATGCTGCCCTTTAG	259
Hu.DMD.Exon49.20.012	GGCTGGTTTTTCCTTGTACA	260
Hu.DMD.Exon49.20.013	CTTCACTGGCTGAGTGGCTG	261
Hu.DMD.Exon49.20.014	ATTACCTTCACTGGCTGAGT	262
Hu.DMD.Exon49.20.015	GCTTCATTACCTTCACTGGC	263
Hu.DMD.Exon49.20.016	AGGTTGCTTCATTACCTTCA	264
Hu.DMD.Exon49.20.017	GCTAGAGGTTGCTTCATTAC	265
Hu.DMD.Exon49.20.018	ATATTGCTAGAGGTTGCTTC	266
Hu.DMD.Exon50.25.001	CTTTAACAGAAAAGCATACACATTA	267
Hu.DMD.Exon50.25.002	TCCTCTTTAACAGAAAAGCATACAC	268
Hu.DMD.Exon50.25.002. 2	TTCCTCTTTAACAGAAAAGCATACA	269
Hu.DMD.Exon50.25.003	TAACTTCCTCTTTAACAGAAAAGCA	270

Hu.DMD.Exon50.25.003. 2	CTAACTTCCTCTTTAACAGAAAAGC	271
Hu.DMD.Exon50.25.004	TCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGAA	272
Hu.DMD.Exon50.25.004. 2	ATCTTCTAACTTCCTCTTTAACAGA	273
Hu.DMD.Exon50.25.005	TCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTAA	274
Hu.DMD.Exon50.25.005. 2	CTCAGATCTTCTAACTTCCTCTTTA	275
Hu.DMD.Exon50.25.006	AGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCTC	276
Hu.DMD.Exon50.25.006. 2 NG-08-0731	CAGAGCTCAGATCTTCTAACTTCCT	277
Hu.DMD.Exon50.25.007	CACTCAGAGCTCAGATCTTCTACT	278
Hu.DMD.Exon50.25.007. 2	CCTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTC	279
Hu.DMD.Exon50.25.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTCCACTC	280
Hu.DMD.Exon50.25.009	CTTTGCCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	281
Hu.DMD.Exon50.25.009. 2	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAACGGTT	282
Hu.DMD.Exon50.25.010	CCAGGAGCTAGGTCAGGCTGCTTTG	283
Hu.DMD.Exon50.25.010. 2	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTCAGCTC	284
Hu.DMD.Exon50.25.011	AGGCTCCAATAGTGGTCAGTCCAGG	285
Hu.DMD.Exon50.25.011. 2	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCAGGCTG	286
Hu.DMD.Exon50.25.012 AVI-5038	CTTACAGGCTCCAATAGTGGTCAGT	287
Hu.DMD.Exon50.25.013	GTATACTTACAGGCTCCAATAGTGG	288
Hu.DMD.Exon50.25.014	ATCCAGTATACTTACAGGCTCCAAT	289
Hu.DMD.Exon50.25.015 NG-08-0741	ATGGGATCCAGTATACTTACAGGCT	290

Hu.DMD.Exon50.25.016 NG-08-0742	AGAGAATGGGATCCAGTATACTTAC	291
Hu.DMD.Exon50.20.001	ACAGAAAAGCATACACATTA	292
Hu.DMD.Exon50.20.002	TTTAACAGAAAAGCATACAC	293
Hu.DMD.Exon50.20.003	TCCTCTTTAACAGAAAAGCA	294
Hu.DMD.Exon50.20.004	TAACCTCCTCTTTAACAGAA	295
Hu.DMD.Exon50.20.005	TCTTCTAACTTCCTCTTTAA	296
Hu.DMD.Exon50.20.006	TCAGATCTTCTAACTTCCTC	297
Hu.DMD.Exon50.20.007	CCTTCCACTCAGAGCTCAGA	298
Hu.DMD.Exon50.20.008	GTAAACGGTTTACCGCCTTC	299
Hu.DMD.Exon50.20.009	CCCTCAGCTCTTGAAGTAAA	300
Hu.DMD.Exon50.20.010	GGTCAGGCTGCTTTGCCCTC	301
Hu.DMD.Exon50.20.011	TCAGTCCAGGAGCTAGGTCA	302
Hu.DMD.Exon50.20.012	AGGCTCCAATAGTGGTCAGT	303
Hu.DMD.Exon50.20.013	CTTACAGGCTCCAATAGTGG	304
Hu.DMD.Exon50.20.014	GTATACTTACAGGCTCCAAT	305
Hu.DMD.Exon50.20.015	ATCCAGTATACTTACAGGCT	306
Hu.DMD.Exon50.20.016	ATGGGATCCAGTATACTTAC	307
Hu.DMD.Exon50.20.017	AGAGAATGGGATCCAGTATA	308
Hu.DMD.Exon51.25.001- 44	CTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAAAA	309
Hu.DMD.Exon51.25.002- 45	GCTAAAATATTTTGGGTTTTTGCAAA	310
Hu.DMD.Exon51.25.002. 2-46	TAGGAGCTAAAATATTTTGGGTTTTT	311
Hu.DMD.Exon51.25.003	AGTAGGAGCTAAAATATTTTGGGTT	312
Hu.DMD.Exon51.25.003. 2	TGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	313
Hu.DMD.Exon51.25.004	CTGAGTAGGAGCTAAAATATTTTGGG	314
Hu.DMD.Exon51.25.004. 2	CAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	315

Hu.DMD.Exon51.25.005	ACAGTCTGAGTAGGAGCTAAAATATT	316
Hu.DMD.Exon51.25.005. 2	GAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCTAAA	317
Hu.DMD.Exon51.25.006	CAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGCT	318
Hu.DMD.Exon51.25.006. 2	CACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAG	319
Hu.DMD.Exon51.25.007	GTCACCAGAGTAACAGTCTGAGTAG	320
Hu.DMD.Exon51.25.007. 2	AACCACAGGTTGTGTCCACCAGAGTAA	321
Hu.DMD.Exon51.25.008	GTTGTGTCCACCAGAGTAACAGTCTG	322
Hu.DMD.Exon51.25.009	TGGCAGTTTCCTTAGTAACCACAGGT	323
Hu.DMD.Exon51.25.010	ATTTCTAGTTTGGAGATGGCAGTTTC	324
Hu.DMD.Exon51.25.010. 2	GGAAGATGGCATTTCCTAGTTTGGAG	325
Hu.DMD.Exon51.25.011	CATCAAGGAAGATGGCATTTCCTAGTT	326
Hu.DMD.Exon51.25.011. 2	GAGCAGGTACCTCCAACATCAAGGAA	327
Hu.DMD.Exon51.25.012	ATCTGCCAGAGCAGGTACCTCCAAC	328
Hu.DMD.Exon51.25.013	AAGTTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAAT	329
Hu.DMD.Exon51.25.013. 2	CGGTTGAAATCTGCCAGAGCAGGTAC	330
Hu.DMD.Exon51.25.014	GAGAAAGCCAGTCGGTAAGTTCTGTC	331
Hu.DMD.Exon51.25.014. 2	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAGCCCGG	332
Hu.DMD.Exon51.25.015	ATAACTTGATCAAGCAGAGAAAGCCA	333
Hu.DMD.Exon51.25.015. 2	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGGTAAGT	334
Hu.DMD.Exon51.25.016	CACCCTCTGTGATTTTATAACTTGAT	335
Hu.DMD.Exon51.25.017	CAAGGTCACCCACCATCACCCTCTGT	336
Hu.DMD.Exon51.25.017. 2	CATCACCCTCTGTGATTTTATAACT	337

Hu.DMD.Exon51.25.018	CTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTGA	338
Hu.DMD.Exon51.25.019	CCTTCTGCTTGATGATCATCTCGTTG	339
Hu.DMD.Exon51.25.019. 2	ATCTCGTTGATATCCTCAAGGTCACC	340
Hu.DMD.Exon51.25.020	TCATACCTTCTGCTTGATGATCATCT	341
Hu.DMD.Exon51.25.020. 2	TCATTTTTTCTCATACCTTCTGCTTG	342
Hu.DMD.Exon51.25.021	TTTTCTCATACCTTCTGCTTGATGAT	343
Hu.DMD.Exon51.25.022	TTTTATCATTTTTTCTCATACCTTCT	344
Hu.DMD.Exon51.25.023	CCAACTTTTATCATTTTTTCTCATAC	345
Hu.DMD.Exon51.20.001	ATATTTTGGGTTTTTGCAA	346
Hu.DMD.Exon51.20.002	AAAATATTTTGGGTTTTTG	347
Hu.DMD.Exon51.20.003	GAGCTAAAATATTTTGGGTT	348
Hu.DMD.Exon51.20.004	AGTAGGAGCTAAAATATTTT	349
Hu.DMD.Exon51.20.005	GTCTGAGTAGGAGCTAAAAT	350
Hu.DMD.Exon51.20.006	TAACAGTCTGAGTAGGAGCT	351
Hu.DMD.Exon51.20.007	CAGAGTAACAGTCTGAGTAG	352
Hu.DMD.Exon51.20.008	CACAGGTTGTGTCACCAGAG	353
Hu.DMD.Exon51.20.009	AGTTTCCTTAGTAACCACAG	354
Hu.DMD.Exon51.20.010	TAGTTTGGAGATGGCAGTTT	355
Hu.DMD.Exon51.20.011	GGAAGATGGCATTCTAGTT	356
Hu.DMD.Exon51.20.012	TACCTCCAACATCAAGGAAG	357
Hu.DMD.Exon51.20.013	ATCTGCCAGAGCAGGTACCT	358
Hu.DMD.Exon51.20.014	CCAAGCCCGGTTGAAATCTG	359
Hu.DMD.Exon51.20.015	GTCGGTAAGTTCTGTCCAAG	360
Hu.DMD.Exon51.20.016	AAGCAGAGAAAGCCAGTCGG	361
Hu.DMD.Exon51.20.017	TTTTATAACTTGATCAAGCA	362
Hu.DMD.Exon51.20.018	CATCACCTCTGTGATTTTA	363
Hu.DMD.Exon51.20.019	CTCAAGGTCACCCACCATCA	364
Hu.DMD.Exon51.20.020	CATCTCGTTGATATCCTCAA	365
Hu.DMD.Exon51.20.021	CTTCTGCTTGATGATCATCT	366

Hu.DMD.Exon51.20.022	CATACCTTCTGCTTGATGAT	367
Hu.DMD.Exon51.20.023	TTTCTCATACCTTCTGCTTG	368
Hu.DMD.Exon51.20.024	CATTTTTTCTCATACCTTCT	369
Hu.DMD.Exon51.20.025	TTTATCATTTTTTCTCATAC	370
Hu.DMD.Exon51.20.026	CAACTTTTATCATTTTTTCT	371
Hu.DMD.Exon52.25.001	CTGTAAGAACAAATATCCCTTAGTA	372
Hu.DMD.Exon52.25.002	TGCCTGTAAGAACAAATATCCCTTA	373
Hu.DMD.Exon52.25.002. 2	GTTGCCTGTAAGAACAAATATCCCT	374
Hu.DMD.Exon52.25.003	ATTGTTGCCTGTAAGAACAAATATC	375
Hu.DMD.Exon52.25.003. 2	GCATTGTTGCCTGTAAGAACAAATA	376
Hu.DMD.Exon52.25.004	CCTGCATTGTTGCCTGTAAGAACAA	377
Hu.DMD.Exon52.25.004. 2	ATCCTGCATTGTTGCCTGTAAGAAC	378
Hu.DMD.Exon52.25.005	CAAATCCTGCATTGTTGCCTGTAAG	379
Hu.DMD.Exon52.25.005. 2	TCCAAATCCTGCATTGTTGCCTGTA	380
Hu.DMD.Exon52.25.006	TGTTCCAAATCCTGCATTGTTGCCT	381
Hu.DMD.Exon52.25.006. 2	TCTGTTCCAAATCCTGCATTGTTGC	382
Hu.DMD.Exon52.25.007	AACTGGGGACGCCTCTGTTCCAAAT	383
Hu.DMD.Exon52.25.007. 2	GCCTCTGTTCCAAATCCTGCATTGT	384
Hu.DMD.Exon52.25.008	CAGCGGTAATGAGTTCTTCCAACCTG	385
Hu.DMD.Exon52.25.008. 2	CTTCCAACCTGGGGACGCCTCTGTTC	386
Hu.DMD.Exon52.25.009	CTTGTTTTTCAAATTTTGGGCAGCG	387
Hu.DMD.Exon52.25.010	CTAGCCTCTTGATTGCTGGTCTTGT	388
Hu.DMD.Exon52.25.010. 2	TTTTCAAATTTTGGGCAGCGGTAAT	389

Hu.DMD.Exon52.25.011	TTCGATCCGTAATGATTGTTCTAGC	390
Hu.DMD.Exon52.25.011. 2	GATTGCTGGTCTTGTTTTTCAAATT	391
Hu.DMD.Exon52.25.012	CTTACTTCGATCCGTAATGATTGTT	392
Hu.DMD.Exon52.25.012. 2	TTGTTCTAGCCTCTTGATTGCTGGT	393
Hu.DMD.Exon52.25.013	AAAACTTACTTCGATCCGTAATGA	394
Hu.DMD.Exon52.25.014	TGTTAAAAAACTTACTTCGATCCGT	395
Hu.DMD.Exon52.25.015	ATGCTTGTTAAAAAACTTACTTCGA	396
Hu.DMD.Exon52.25.016	GTCCCATGCTTGTTAAAAAACTTAC	397
Hu.DMD.Exon52.20.001	AGAACAAATATCCCTTAGTA	398
Hu.DMD.Exon52.20.002	GTAAGAACAAATATCCCTTA	399
Hu.DMD.Exon52.20.003	TGCCTGTAAGAACAAATATC	400
Hu.DMD.Exon52.20.004	ATTGTTGCCTGTAAGAACAA	401
Hu.DMD.Exon52.20.005	CCTGCATTGTTGCCTGTAAG	402
Hu.DMD.Exon52.20.006	CAAATCCTGCATTGTTGCCT	403
Hu.DMD.Exon52.20.007	GCCTCTGTTCCAAATCCTGC	404
Hu.DMD.Exon52.20.008	CTTCCAACCTGGGGACGCCTC	405
Hu.DMD.Exon52.20.009	CAGCGGTAATGAGTTCTTCC	406
Hu.DMD.Exon52.20.010	TTTTCAAATTTTGGGCAGCG	407
Hu.DMD.Exon52.20.011	GATTGCTGGTCTTGTTTTTC	408
Hu.DMD.Exon52.20.012	TTGTTCTAGCCTCTTGATTG	409
Hu.DMD.Exon52.20.013	TTCGATCCGTAATGATTGTT	410
Hu.DMD.Exon52.20.014	CTTACTTCGATCCGTAATGA	411
Hu.DMD.Exon52.20.015	AAAACTTACTTCGATCCGT	412
Hu.DMD.Exon52.20.016	TGTTAAAAAACTTACTTCGA	413
Hu.DMD.Exon52.20.017	ATGCTTGTTAAAAAACTTAC	414
Hu.DMD.Exon52.20.018	GTCCCATGCTTGTTAAAAAA	415
Hu.DMD.Exon53.25.001	CTAGAATAAAAGGAAAAATAAATAT	416
Hu.DMD.Exon53.25.002	AACTAGAATAAAAGGAAAAATAAAT	417
Hu.DMD.Exon53.25.002.	TTCAACTAGAATAAAAGGAAAAATA	418

2		
Hu.DMD.Exon53.25.003	CTTTCAACTAGATAAAAAGGAAAAA	419
Hu.DMD.Exon53.25.003.	ATTCTTTCAACTAGATAAAAAGGAA	420
2		
Hu.DMD.Exon53.25.004	GAATTCTTTCAACTAGATAAAAAGG	421
Hu.DMD.Exon53.25.004.	TCTGAATTCTTTCAACTAGATAAAA	422
2		
Hu.DMD.Exon53.25.005	ATTCTGAATTCTTTCAACTAGATA	423
Hu.DMD.Exon53.25.005.	CTGATTCTGAATTCTTTCAACTAGA	424
2		
Hu.DMD.Exon53.25.006	CACTGATTCTGAATTCTTTCAACTA	425
Hu.DMD.Exon53.25.006.	TCCCACTGATTCTGAATTCTTTCAA	426
2		
Hu.DMD.Exon53.25.007	CATCCCACTGATTCTGAATTCTTTC	427
Hu.DMD.Exon53.25.008	TACTTCATCCCACTGATTCTGAATT	428
Hu.DMD.Exon53.25.008.	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	429
2		
Hu.DMD.Exon53.25.009	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTACT	430
Hu.DMD.Exon53.25.009.	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGT	431
2		
Hu.DMD.Exon53.25.010	TTTCATTCAACTGTTGCCTCCGGTT	432
Hu.DMD.Exon53.25.010.	TAACATTTCAATTCAACTGTTGCCTC	433
2		
Hu.DMD.Exon53.25.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACATTTCA	434
Hu.DMD.Exon53.25.012	TCTTCCTTAGCTTCCAGCCATTGTG	435
Hu.DMD.Exon53.25.012.	CTTAGCTTCCAGCCATTGTGTTGAA	436
2		
Hu.DMD.Exon53.25.013	GTCCTAAGACCTGCTCAGCTTCTTC	437
Hu.DMD.Exon53.25.013.	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAGCTTCC	438
2		
Hu.DMD.Exon53.25.014	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCTGTCCT	439

Hu.DMD.Exon53.25.014. 2	GGCCTGTCCTAAGACCTGCTCAGCT	440
Hu.DMD.Exon53.25.015	TAGGGACCCTCCTTCCATGACTCAA	441
Hu.DMD.Exon53.25.016	TTTGGATTGCATCTACTGTATAGGG	442
Hu.DMD.Exon53.25.016. 2	ACCCTCCTTCCATGACTCAAGCTTG	443
Hu.DMD.Exon53.25.017	CTTGGTTTCTGTGATTTTCTTTTGG	444
Hu.DMD.Exon53.25.017. 2	ATCTACTGTATAGGGACCCTCCTTC	445
Hu.DMD.Exon53.25.018	CTAACCTTGGTTTCTGTGATTTTCT	446
Hu.DMD.Exon53.25.018. 2	TTTCTTTTGGATTGCATCTACTGTA	447
Hu.DMD.Exon53.25.019	TGATACTAACCTTGGTTTCTGTGAT	448
Hu.DMD.Exon53.25.020	ATCTTTGATACTAACCTTGGTTTCT	449
Hu.DMD.Exon53.25.021	AAGGTATCTTTGATACTAACCTTGG	450
Hu.DMD.Exon53.25.022	TTAAAAAGGTATCTTTGATACTAAC	451
Hu.DMD.Exon53.20.001	ATAAAAGGAAAAATAAATAT	452
Hu.DMD.Exon53.20.002	GAATAAAAGGAAAAATAAAT	453
Hu.DMD.Exon53.20.003	AACTAGAATAAAAGGAAAAA	454
Hu.DMD.Exon53.20.004	CTTTCAACTAGAATAAAAGG	455
Hu.DMD.Exon53.20.005	GAATTCTTTCAACTAGAATA	456
Hu.DMD.Exon53.20.006	ATTCTGAATTCTTTCAACTA	457
Hu.DMD.Exon53.20.007	TACTTCATCCCACTGATTCT	458
Hu.DMD.Exon53.20.008	CTGAAGGTGTTCTTGTACT	459
Hu.DMD.Exon53.20.009	CTGTTGCCTCCGTTCTGAA	460
Hu.DMD.Exon53.20.010	TAACATTTCACTCAACTGTT	461
Hu.DMD.Exon53.20.011	TTGTGTTGAATCCTTTAACA	462
Hu.DMD.Exon53.20.012	CTTAGCTTCCAGCCATTGTG	463
Hu.DMD.Exon53.20.013	CTGCTCAGCTTCTTCCTTAG	464
Hu.DMD.Exon53.20.014	GGCCTGTCCTAAGACCTGCT	465
Hu.DMD.Exon53.20.015	CTCAAGCTTGGCTCTGGCCT	466

Hu.DMD.Exon53.20.016	ACCCTCCTTCCATGACTCAA	467
Hu.DMD.Exon53.20.017	ATCTACTGTATAGGGACCCT	468
Hu.DMD.Exon53.20.018	TTTCTTTTGGATTGCATCTA	469
Hu.DMD.Exon53.20.019	CTTGGTTTCTGTGATTTTCT	470
Hu.DMD.Exon53.20.020	CTAACCTTGGTTTCTGTGAT	471
Hu.DMD.Exon53.20.021	TGATACTAACCTTGGTTTCT	472
Hu.DMD.Exon53.20.022	ATCTTTGATACTAACCTTGG	473
Hu.DMD.Exon53.20.023	AAGGTATCTTTGATACTAAC	474
Hu.DMD.Exon53.20.024	TTAAAAAGGTATCTTTGATA	475
Hu.DMD.Exon54.25.001	CTATAGATTTTTATGAGAAAGAGA	476
Hu.DMD.Exon54.25.002	AACTGCTATAGATTTTTATGAGAAA	477
Hu.DMD.Exon54.25.003	TGGCCAACTGCTATAGATTTTTATG	478
Hu.DMD.Exon54.25.004	GTCTTTGGCCAACTGCTATAGATTT	479
Hu.DMD.Exon54.25.005	CGGAGGTCTTTGGCCAACTGCTATA	480
Hu.DMD.Exon54.25.006	ACTGGCGGAGGTCTTTGGCCAACTG	481
Hu.DMD.Exon54.25.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAGGTCTT	482
Hu.DMD.Exon54.25.008	AGTCATTTGCCACATCTACATTTGT	483
Hu.DMD.Exon54.25.008. 2	TTTGCCACATCTACATTTGTCTGCC	484
Hu.DMD.Exon54.25.009	CCGGAGAAGTTTCAGGGCCAAGTCA	485
Hu.DMD.Exon54.25.010	GTATCATCTGCAGAATAATCCCGGA	486
Hu.DMD.Exon54.25.010. 2	TAATCCCGGAGAAGTTTCAGGGCCA	487
Hu.DMD.Exon54.25.011	TTATCATGTGGACTTTTCTGGTATC	488
Hu.DMD.Exon54.25.012	AGAGGCATTGATATTCTCTGTTATC	489
Hu.DMD.Exon54.25.012. 2	ATGTGGACTTTTCTGGTATCATCTG	490
Hu.DMD.Exon54.25.013	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	491
Hu.DMD.Exon54.25.013. 2	ATATTCTCTGTTATCATGTGGACTT	492
Hu.DMD.Exon54.25.014	CATACCTTTTATGAATGCTTCTCCA	493

Hu.DMD.Exon54.25.014. 2	CTCCAAGAGGCATTGATATTCTCTG	494
Hu.DMD.Exon54.25.015	TAATTCATACCTTTTATGAATGCTT	495
Hu.DMD.Exon54.25.015. 2	CTTTTATGAATGCTTCTCCAAGAGG	496
Hu.DMD.Exon54.25.016	TAATGTAATTCATACCTTTTATGAA	497
Hu.DMD.Exon54.25.017	AGAAATAATGTAATTCATACCTTTT	498
Hu.DMD.Exon54.25.018	GTTTTAGAAATAATGTAATTCATAC	499
Hu.DMD.Exon54.20.001	GATTTTTATGAGAAAGAGA	500
Hu.DMD.Exon54.20.002	CTATAGATTTTTATGAGAAA	501
Hu.DMD.Exon54.20.003	AACTGCTATAGATTTTTATG	502
Hu.DMD.Exon54.20.004	TGGCCAACTGCTATAGATTT	503
Hu.DMD.Exon54.20.005	GTCTTTGGCCAACTGCTATA	504
Hu.DMD.Exon54.20.006	CGGAGGTCTTTGGCCAACTG	505
Hu.DMD.Exon54.20.007	TTTGTCTGCCACTGGCGGAG	506
Hu.DMD.Exon54.20.008	TTTGCCACATCTACATTTGT	507
Hu.DMD.Exon54.20.009	TTCAGGGCCAAGTCATTTGC	508
Hu.DMD.Exon54.20.010	TAATCCCGGAGAAGTTTCAG	509
Hu.DMD.Exon54.20.011	GTATCATCTGCAGAATAATC	510
Hu.DMD.Exon54.20.012	ATGTGGACTTTTCTGGTATC	511
Hu.DMD.Exon54.20.013	ATATTCTCTGTTATCATGTG	512
Hu.DMD.Exon54.20.014	CTCCAAGAGGCATTGATATT	513
Hu.DMD.Exon54.20.015	CTTTTATGAATGCTTCTCCA	514
Hu.DMD.Exon54.20.016	CATACCTTTTATGAATGCTT	515
Hu.DMD.Exon54.20.017	TAATTCATACCTTTTATGAA	516
Hu.DMD.Exon54.20.018	TAATGTAATTCATACCTTTT	517
Hu.DMD.Exon54.20.019	AGAAATAATGTAATTCATAC	518
Hu.DMD.Exon54.20.020	GTTTTAGAAATAATGTAATT	519
Hu.DMD.Exon55.25.001	CTGCAAAGGACCAAATGTTTCAGATG	520
Hu.DMD.Exon55.25.002	TCACCCTGCAAAGGACCAAATGTTC	521
Hu.DMD.Exon55.25.003	CTCACTCACCCTGCAAAGGACCAAA	522

Hu.DMD.Exon55.25.004	TCTCGCTCACTCACCTGCAAAGGA	523
Hu.DMD.Exon55.25.005	CAGCCTCTCGCTCACTCACCTGCA	524
Hu.DMD.Exon55.25.006	CAAAGCAGCCTCTCGCTCACTCACC	525
Hu.DMD.Exon55.25.007	TCTTCCAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	526
Hu.DMD.Exon55.25.007. 2	TCTATGAGTTTCTTCCAAAGCAGCC	527
Hu.DMD.Exon55.25.008	GTTGCAGTAATCTATGAGTTTCTTC	528
Hu.DMD.Exon55.25.008. 2	GAAGTGTTCAGTAATCTATGAGTT	529
Hu.DMD.Exon55.25.009	TTCCAGGTCCAGGGGGAAGTGTTC	530
Hu.DMD.Exon55.25.010	GTAAGCCAGGCAAGAACTTTTCCA	531
Hu.DMD.Exon55.25.010. 2	CCAGGCAAGAACTTTTCCAGGTCC	532
Hu.DMD.Exon55.25.011	TGGCAGTTGTTTCAGCTTCTGTAAG	533
Hu.DMD.Exon55.25.011. 2	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGGCAAGA	635
Hu.DMD.Exon55.25.012	GGTAGCATCCTGTAGGACATTGGCA	534
Hu.DMD.Exon55.25.012. 2	GACATTGGCAGTTGTTTCAGCTTCT	535
Hu.DMD.Exon55.25.013	TCTAGGAGCCTTTCCTTACGGGTAG	536
Hu.DMD.Exon55.25.014	CTTTTACTCCCTTGGAGTCTTCTAG	537
Hu.DMD.Exon55.25.014. 2	GAGCCTTTCCTTACGGGTAGCATCC	538
Hu.DMD.Exon55.25.015	TTGCCATTGTTTCATCAGCTCTTTT	539
Hu.DMD.Exon55.25.015. 2	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCCTTTCC	540
Hu.DMD.Exon55.25.016	CTTACTTGCCATTGTTTCATCAGCT	541
Hu.DMD.Exon55.25.016. 2	CAGCTCTTTTACTCCCTTGGAGTCT	542
Hu.DMD.Exon55.25.017	CCTGACTTACTTGCCATTGTTTCAT	543
Hu.DMD.Exon55.25.018	AAATGCCTGACTTACTTGCCATTGT	544

Hu.DMD.Exon55.25.019	AGCGGAAATGCCTGACTTACTTGCC	545
Hu.DMD.Exon55.25.020	GCTAAAGCGGAAATGCCTGACTTAC	546
Hu.DMD.Exon55.20.001	AAGGACCAAATGTTTCAGATG	547
Hu.DMD.Exon55.20.002	CTGCAAAGGACCAAATGTTC	548
Hu.DMD.Exon55.20.003	TCACCCTGCAAAGGACCAAA	549
Hu.DMD.Exon55.20.004	CTCACTCACCCTGCAAAGGA	550
Hu.DMD.Exon55.20.005	TCTCGCTCACTCACCCTGCA	551
Hu.DMD.Exon55.20.006	CAGCCTCTCGCTCACTCACC	552
Hu.DMD.Exon55.20.007	CAAAGCAGCCTCTCGCTCAC	553
Hu.DMD.Exon55.20.008	TCTATGAGTTTCTTCCAAAG	554
Hu.DMD.Exon55.20.009	GAAGTGTTCAGTAATCTAT	555
Hu.DMD.Exon55.20.010	TTCCAGGTCCAGGGGGAAGT	556
Hu.DMD.Exon55.20.011	CCAGGCAAGAACTTTTCCA	557
Hu.DMD.Exon55.20.012	TTCAGCTTCTGTAAGCCAGG	558
Hu.DMD.Exon55.20.013	GACATTGGCAGTTGTTTCAG	559
Hu.DMD.Exon55.20.014	GGTAGCATCCTGTAGGACAT	560
Hu.DMD.Exon55.20.015	GAGCCTTTCCTTACGGGTAG	561
Hu.DMD.Exon55.20.016	CTTGGAGTCTTCTAGGAGCC	562
Hu.DMD.Exon55.20.017	CAGCTCTTTTACTCCCTTGG	563
Hu.DMD.Exon55.20.018	TTGCCATTGTTTCATCAGCT	564
Hu.DMD.Exon55.20.019	CTTACTTGCCATTGTTTCAT	565
Hu.DMD.Exon55.20.020	CCTGACTTACTTGCCATTGT	566
Hu.DMD.Exon55.20.021	AAATGCCTGACTTACTTGCC	567
Hu.DMD.Exon55.20.022	AGCGGAAATGCCTGACTTAC	568
Hu.DMD.Exon55.20.023	GCTAAAGCGGAAATGCCTGA	569
H50A(+02+30)-AVI-5656	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAACT TCC	584
H50D(+07-18)-AVI-5915	GGGATCCAGTATACTTACAGGCTCC	585
H50A(+07+33)	CTTCCACTCAGAGCTCAGATCTTCTA A	586
H51A(+61+90)-AVI-4657	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAGT	587

	TTGG	
H51A(+66+95)-AVI-4658	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATT CTAG	588
H51A(+111+134)	TTCTGTCCAAGCCCGGTTGAAATC	589
H51A(+175+195)	CACCCACCATCACCTCYGTG	590
H51A(+199+220)	ATCATCTCGTTGATATCCTCAA	591
H51A(+66+90)	ACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	592
H51A(-01+25)	ACCAGAGTAACAGTCTGAGTAGGAGC	593
h51AON1	TCAAGGAAGATGGCATTCT	594
h51AON2	CCTCTGTGATTTTATAACTTGAT	595
H51D(+08-17)	ATCATTTTTTCTCATACCTTCTGCT	596
H51D(+16-07)	CTCATACCTTCTGCTTGATGATC	597
hAON#23	TGGCATTCTAGTTTGG	598
hAON#24	CCAGAGCAGGTACCTCCAACATC	599
H44A(+61+84)	TGTTTCAGCTTCTGTTAGCCACTGA	600
H44A(+85+104)	TTTGTGTCTTTCTGAGAAAC	601
h44AON1	CGCCGCCATTTCTCAACAG	602
H44A(-06+14)	ATCTGTCAAATCGCCTGCAG	603
H45A(+71+90)	TGTTTTTGAGGATTGCTGAA	604
h45AON1	GCTGAATTATTTCTTCCCC	605
h45AON5	GCCCAATGCCATCCTGG	606
H45A(-06+20)	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA	607
H53A(+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGA AGGTG	608
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	609
h53AON1	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	610
H53A(-12+10)	ATTCTTTCAACTAGAATAAAAG	611
huEx45.30.66	GCCATCCTGGAGTTCCTGTAAGATAC CAAA	612
huEx45.30.71	CCAATGCCATCCTGGAGTTCCTGTAA GATA	613

huEx45.30.79	GCCGCTGCCCAATGCCATCCTGGAG TTCCT	614
huEx45.30.83	GTTTGCCGCTGCCCAATGCCATCCTG GAGT	615
huEx45.30.88	CAACAGTTTGCCGCTGCCCAATGCCA TCCT	616
huEx45.30.92	CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCCAAT GCCA	617
huEx45.30.96	TGTTCTGACAACAGTTTGCCGCTGCC CAAT	618
huEx45.30.99	CAATGTTCTGACAACAGTTTGCCGCT GCCC	619
huEx45.30.103	CATTCAATGTTCTGACAACAGTTTGC CGCT	620
huEx45.30.120	TATTTCTTCCCCAGTTGCATTCAATGT TCT	621
huEx45.30.127	GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGCAT TCA	622
huEx45.30.132	GGATTGCTGAATTATTTCTTCCCCAGT TGC	623
huEx45.30.137	TTTGAGGATTGCTGAATTATTTCTTCC CCA	624
huEx53.30.84	GTA CTTCATCCCACTGATTCTGAATTC TTT	625
huEx53.30.88	TCTTGTA CTTCATCCCACTGATTCTGA ATT	626
huEx53.30.91	TGTTCTTGTA CTTCATCCCACTGATTC TGA	627
huEx53.30.103	CGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA CTTC ATCC	628
huEx53.30.106	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA C 629	

	TTCA	
huEx53.30.109	TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG TACT	630
huEx53.30.112	TGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC TTGT	631
huEx53.30.115	AACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG TTCT	632
huEx53.30.118	TTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAG GTGT	633
h50AON1		
H50AON2		
<u>Transportadores de Peptídeos (NH₂ para COOH)*:</u>		
rTAT	RRRQRRKKRC	570
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFFC	571
(RAhx) ₄ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRB	572
(RAhxR) ₄ AhxB; (P007)	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	573
(AhxRR) ₄ AhxB	AhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	574
(RAhx) ₆ B	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	575
(RAhx) ₈ B	RahxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRA hx B	576
(RAhxR) ₅ AhxB	RAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRAhxRB	577
(RAhxRRBR) ₂ AhxB; (CPO6062)	RAhxRRBRRAhxRRBRAhxRB	578
MSP	ASSLNIA	579
Célula de Penetração de Peptídeo / “homing” Peptídeo / PMO Conjugados (NH₂ para COOH e 5' para 3')		
MSP-PMO	ASSLNIA-XB- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	580 636
CP06062-MSP-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB-ASSLNIA-X- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	581 636

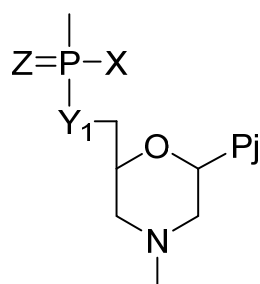
MSP-CP06062-PMO	ASSLNIA-X-RXRRBRRXRRBR-B- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	582 636
CP06062-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	583 636

* AHX é o ácido 6-aminohexanóico e B é a beta-alanina.

REIVINDICAÇÕES

1. Oligômero morfolino fosforodiamidato **CARACTERIZADO** pelo fato de que consiste em 25 subunidades de morfolino consistindo na sequência de bases 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA-3' (SEQ ID NO: 4).

2. Oligômero morfolino fosforodiamidato, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as subunidades são de acordo com a Fórmula (I):



Fórmula (I) ,

em que:

Y₁ é -O-;

Z é O;

X é alquilamino; e

cada Pj é adenina, guanina, timina ou citosina, que juntas formam a sequência de bases 5'-GATCTGTCAAATCGCCTGCAGGTAA-3' (SEQ ID NO: 4).

3. Oligômero morfolino fosforodiamidato, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende ainda trietilenoglicol conjugado ao oligômero na extremidade 5' através de um ligante, em que o ligante é uma fração piperazinil opcionalmente substituída.

4. Oligômero morfolino fosforodiamidato, de acordo com a reivindicação 2 ou 3, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o oligômero morfolino é conjugado a um peptídeo-arginina.

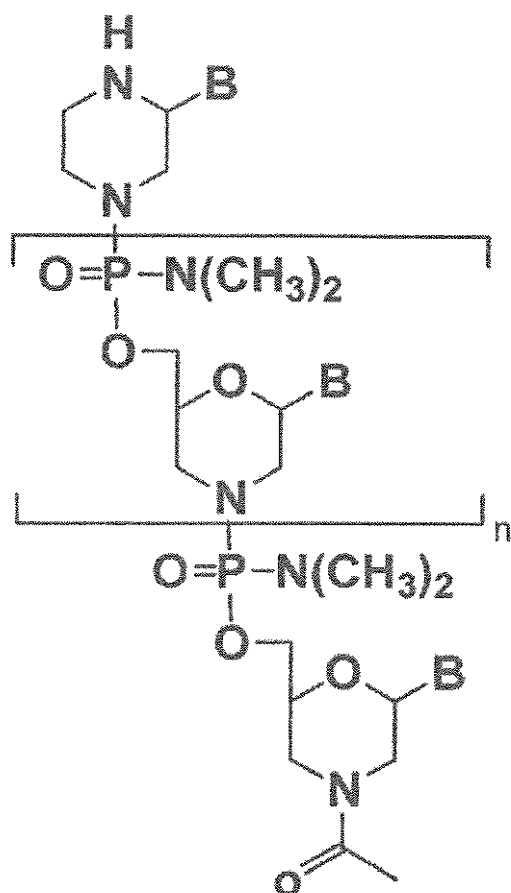
5. Composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende o oligômero morfolino fosforodiamidato, como definido em qualquer uma das reivindicações 2 a 4,

e um veículo farmacêuticamente aceitável.

6. Composição, acordo com a reivindicação 5, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que é para uso no tratamento de distrofia muscular.

7. Composição, acordo com a reivindicação 6, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que a distrofia muscular é distrofia muscular de Duchenne.

8. Uso do oligômero morfolino fosforodiamidato, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que é para a formulação de um medicamento para o tratamento de distrofia muscular.

*FIG. 1A*

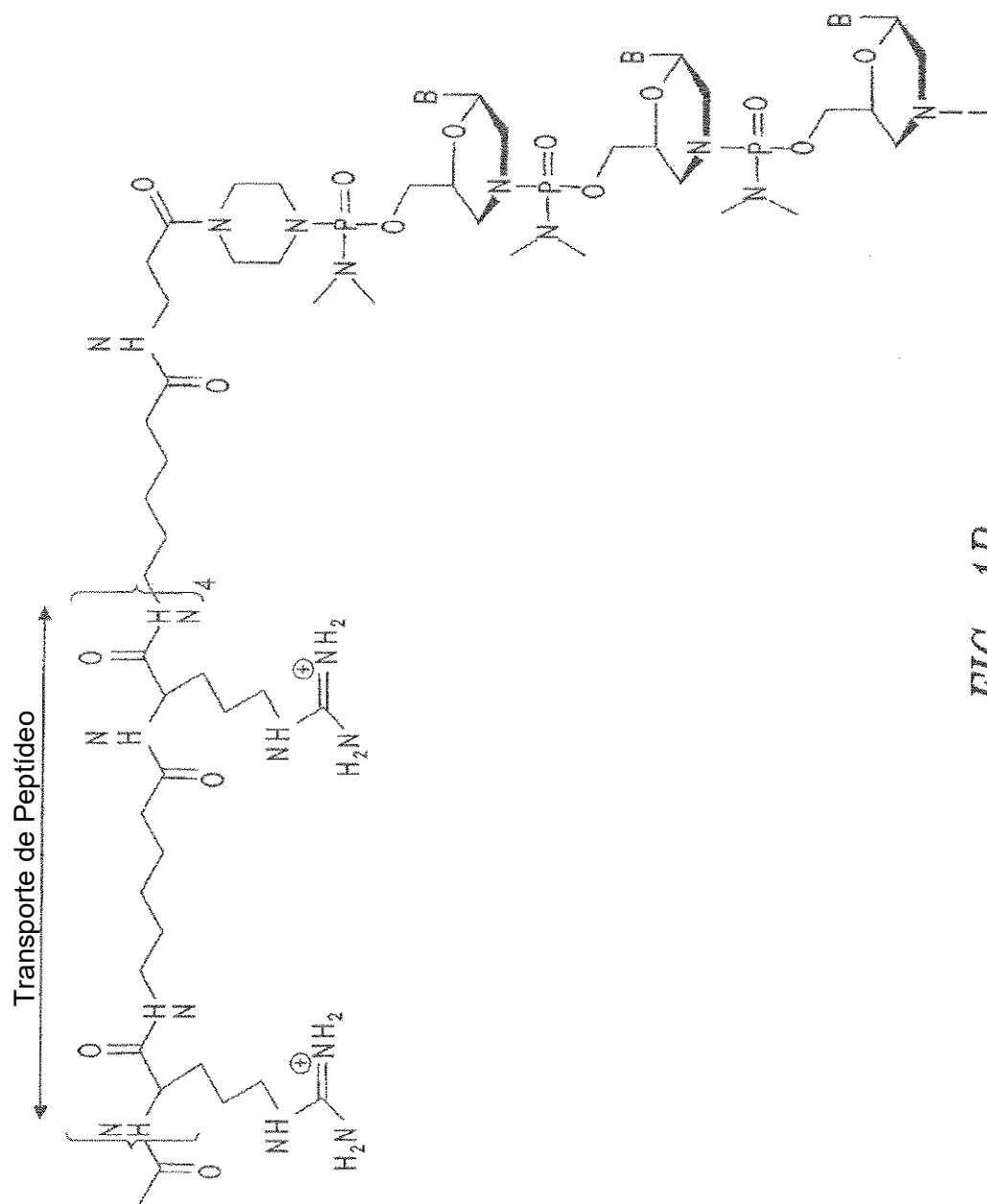


FIG. 1B

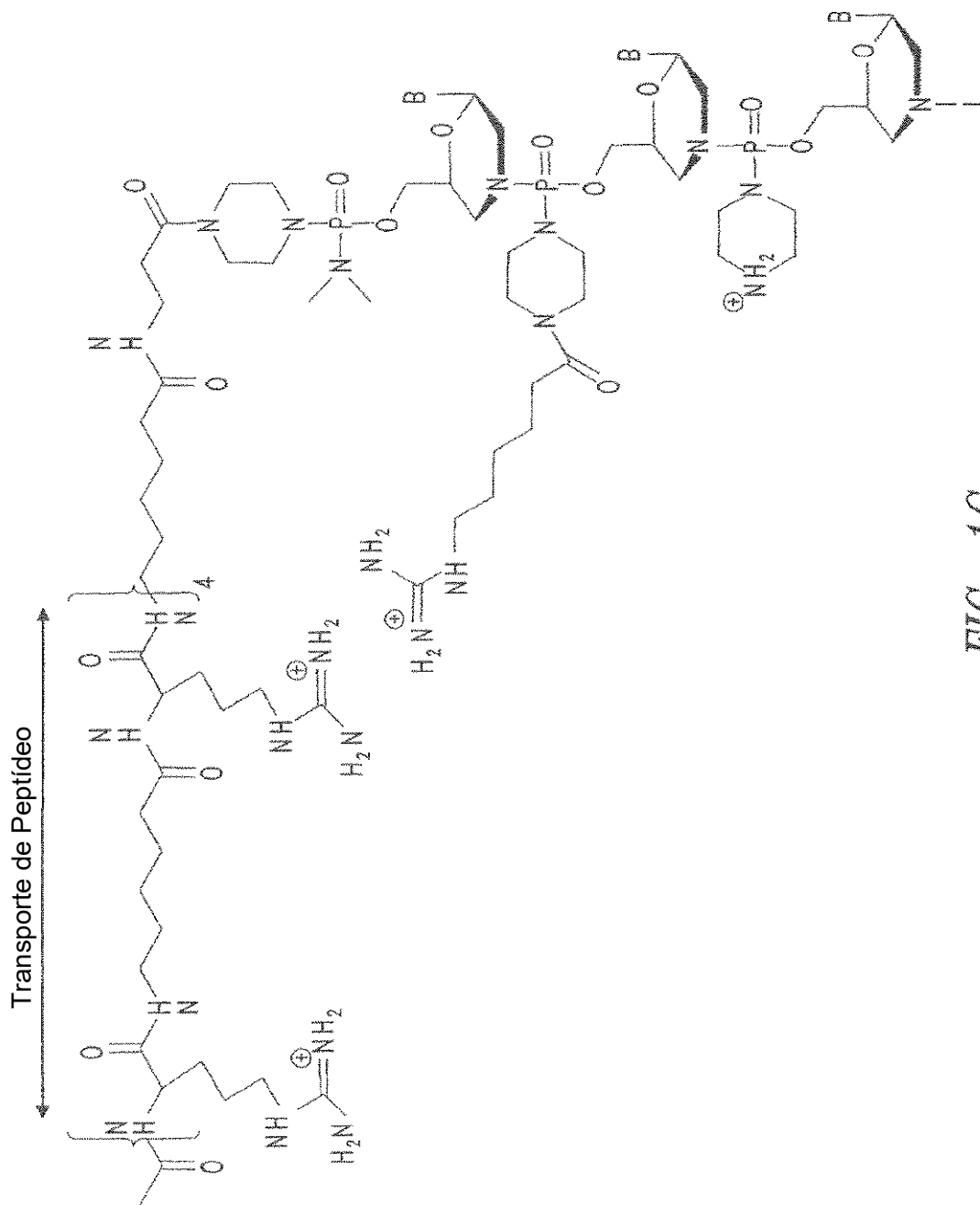
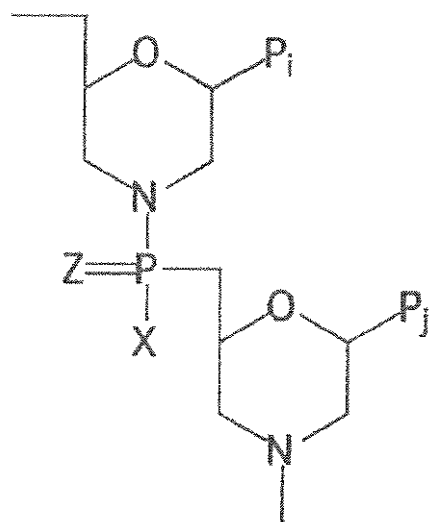
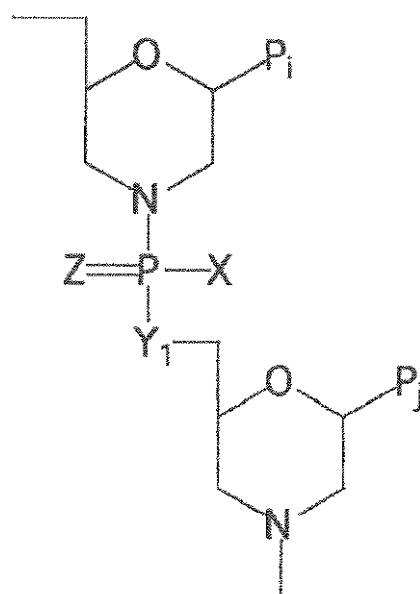
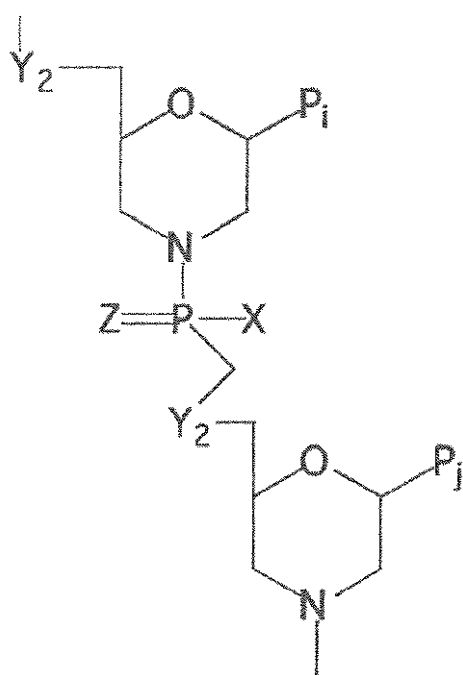
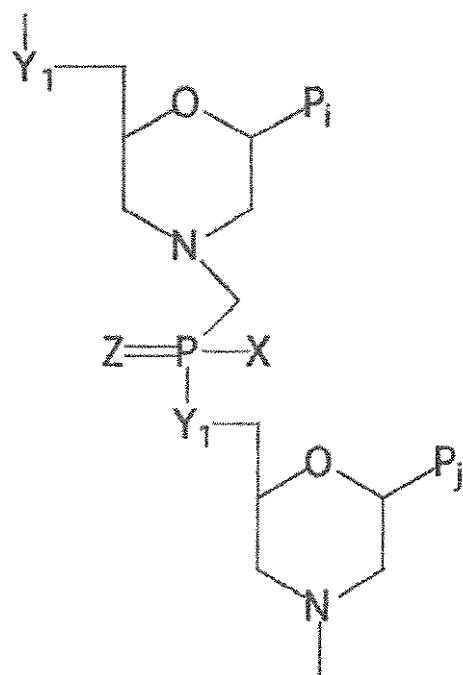
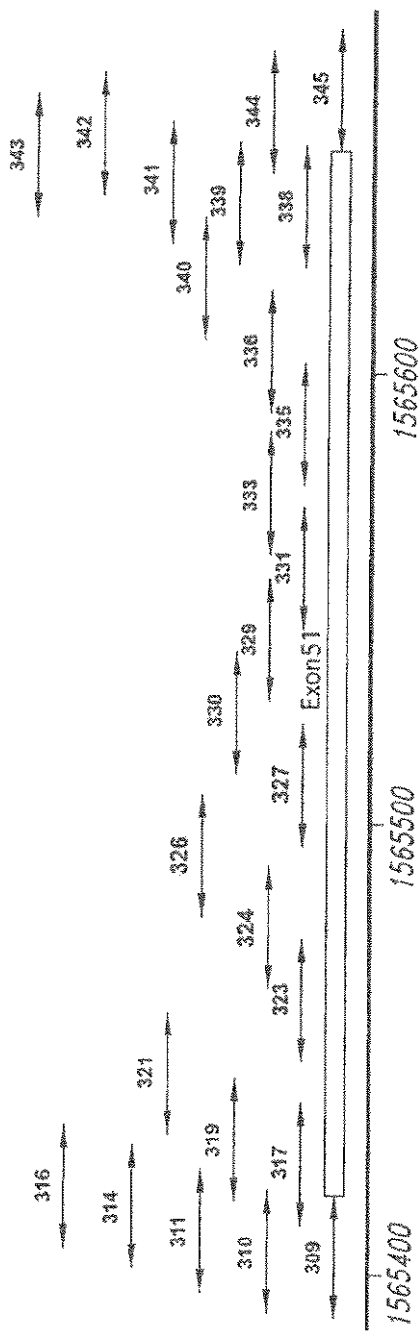


FIG. 1C

*FIG. 1D**FIG. 1E**FIG. 1F**FIG. 1G*

Distrofina Exon 51 Scan Oligos
DMD Gene 1756



Oligo SEQ ID Nos Mostrados – SEQ ID Nos 324, 326 e 327 foram mais eficazes

FIG. 2A

Exon 51S.3 (RD)

Síntese de Alta Pureza, 3.0 uM, Células RD

Oligo	Nome; SEQ ID NO	Lote
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JNJ12-R(E4)

NG-09-0053 (SEQ ID NO:324)	NG-09-0054 (SEQ ID NO:326)	NG-09-0055 (SEQ ID NO:327)	NG-07-1160 (SEQ ID NO:588)
4.65% ±1.89	7.40% ±0.75	9.89% ±1.37	5.26% ±0.66




FIG. 2B

51MCS (Tela Concorrente de Célula Muscular)

Síntese de Alta Pureza, 3.0 uM (Células Primárias do Músculo Esquelético Humano)

Oligo	Nome; SEQ ID NO	Lote
NG-07-1160	AVI-5658; 588	09MY11-R(E4)
NG-09-0053	053; 324	09JNJ12-R(A4)
NG-09-0054	054; 326	09JNJ12-R(B4)
NG-09-0055	055; 327	09JNJ12-R(E4)
NG-08-0835	h51AON1; 594	09JL07-R(A1)

NG-09-0053 SEQ ID NO:324	NG-09-0054 SEQ ID NO:326	NG-09-0055 SEQ ID NO:327	No tx	NG-07-1160 SEQ ID NO:588	NG-08-0835 SEQ ID NO:594
1.02% ±0.30	1.12% ±0.08	1.30% ±0.40	0%	1.10% ±0.13	0.14% ±0.07

FIG. 2C

Oligos Seleccionados de Exon 51 da Distrofina

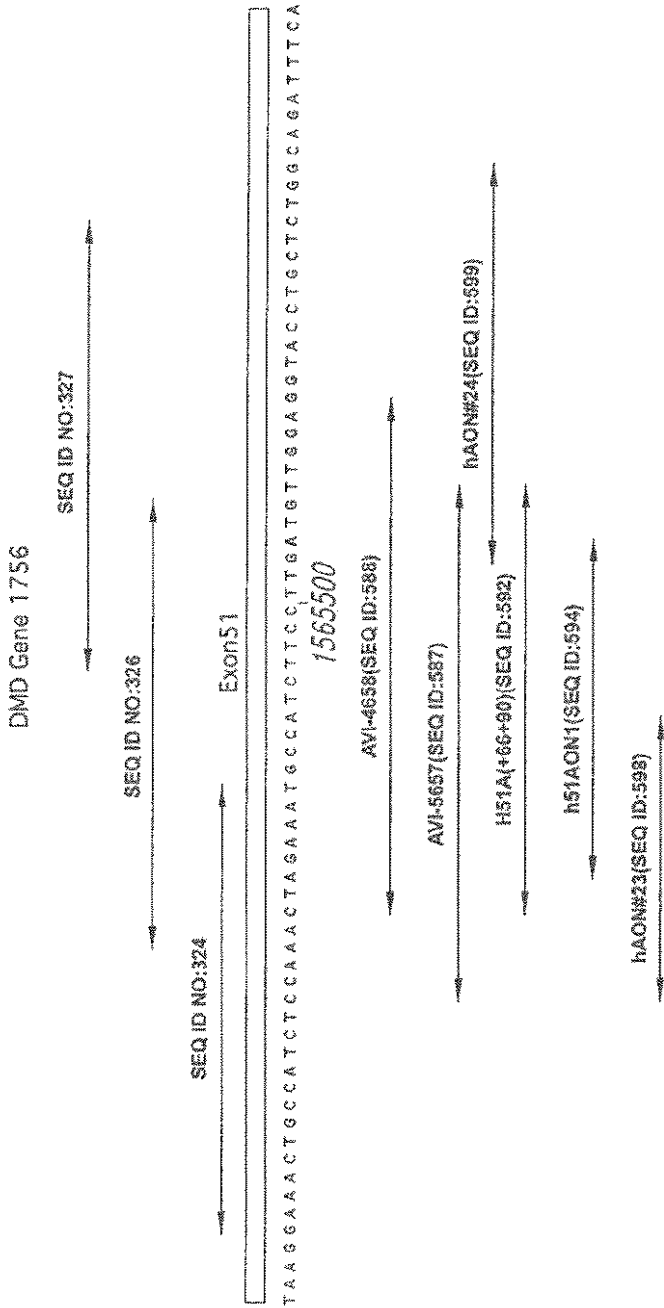


FIG. 2D

Scan Oligos de Exon 50 da Distrofina

DMD Gene 1756

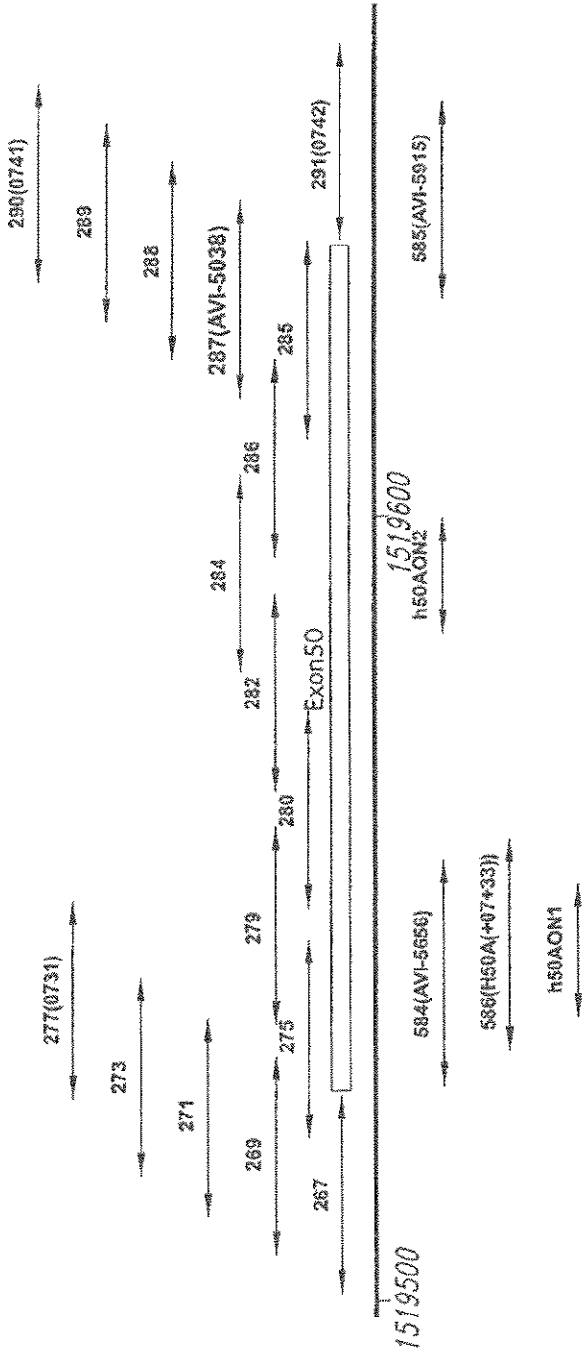
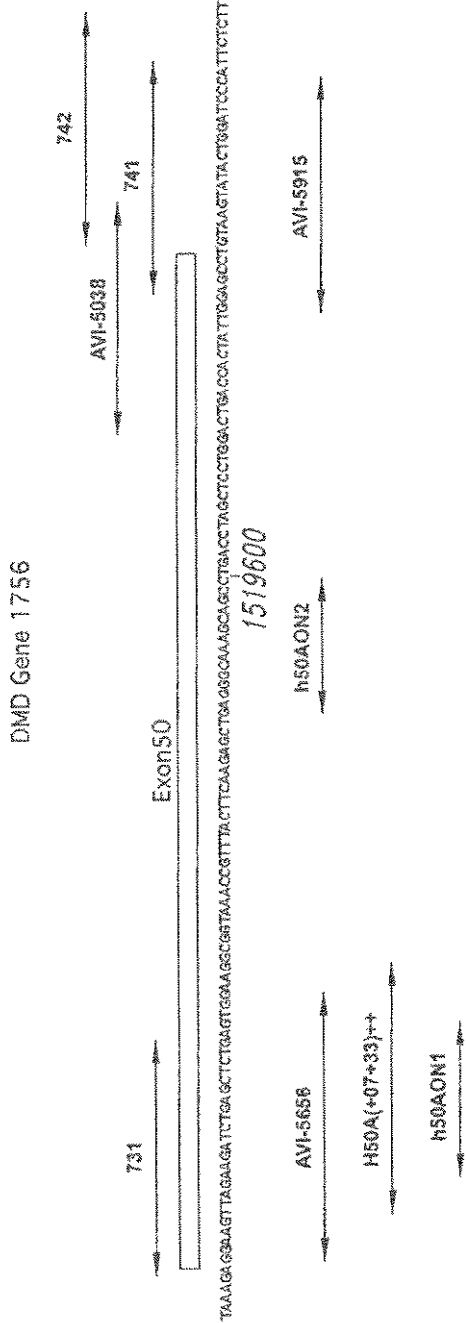


FIG. 3A

Oligos Selecionados de Exon 50 da Distrofina



Compound	EC ₅₀ (micromolar)*
AVI-5656 (SEQ ID NO:584)	0.921
AVI-5915 (SEQ ID NO:585)	3.693
NG-08-0731 (SEQ ID NO:277)	1.741
AVI-5038 (SEQ ID NO:287)	0.966
NG-08-0741 (SEQ ID NO:290)	1.836
NG-08-0742 (SEQ ID NO:291)	2.402

* Determinada a partir de estudos de dose em células RD
AVI #00453 - 02FEB2009

FIG. 3B

Scan Oligos de Exon 53 da Distrofina

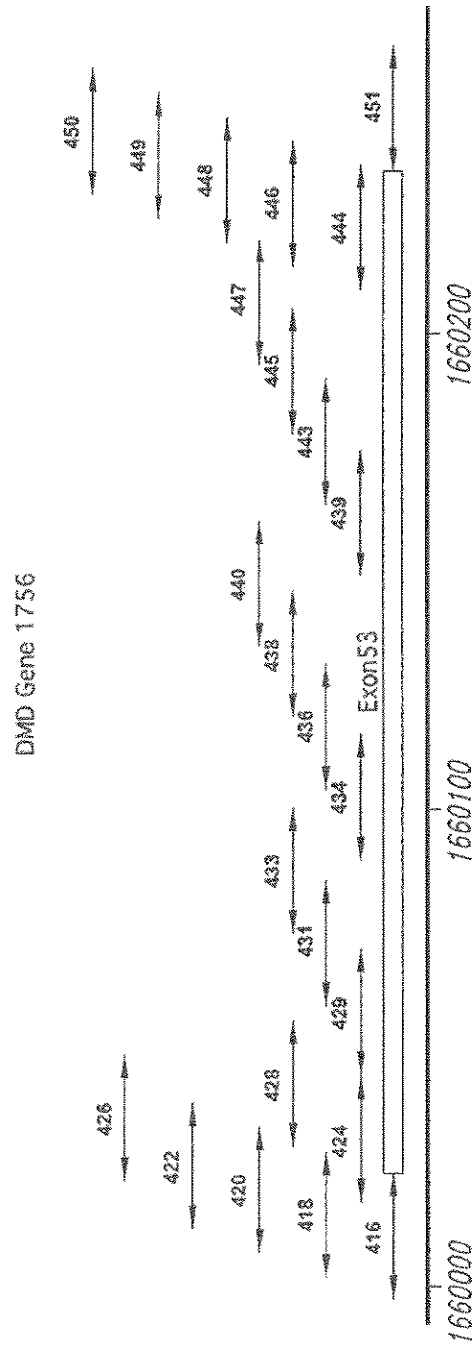


FIG. 4A

Oligos Seleccionados de Exon 53 da Distrofina

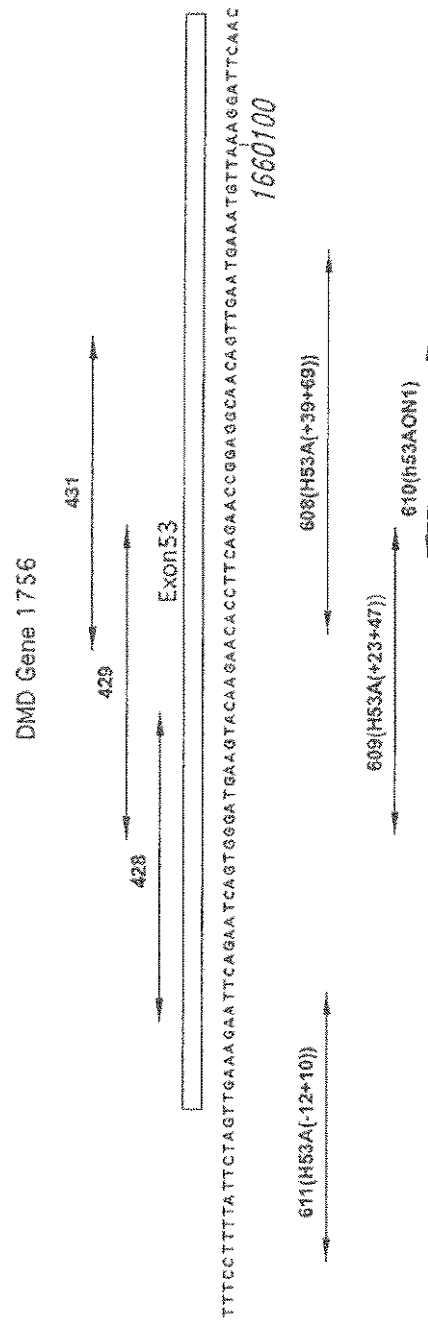


FIG. 4B

Exon 53 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0746 09AU11-R(E5) (SEQ ID NO: 422)



FIG. 4C

Exon 53 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0749 09AU11-R(A7) (SEQ ID NO: 428)

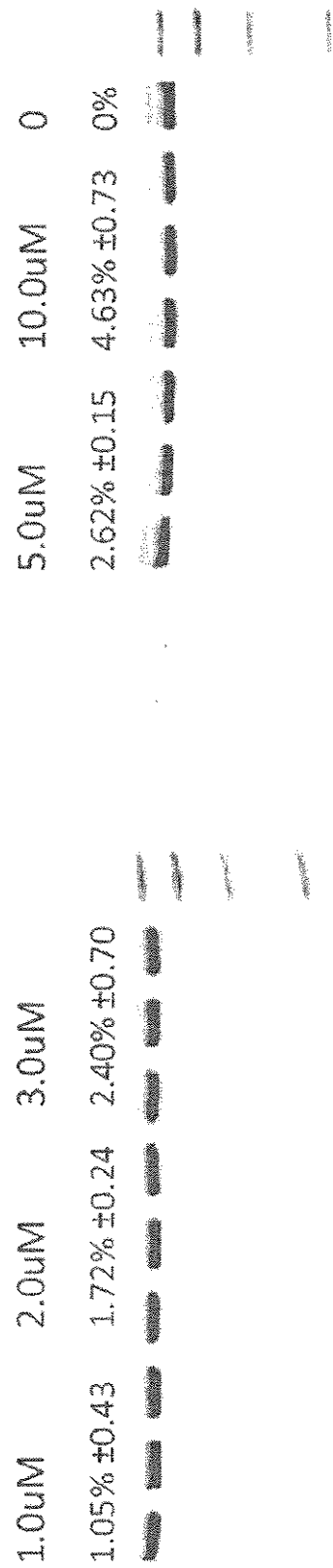


FIG. 4D

Exon 53 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0750 09AU11-R(C7) (SEQ ID NO: 429)

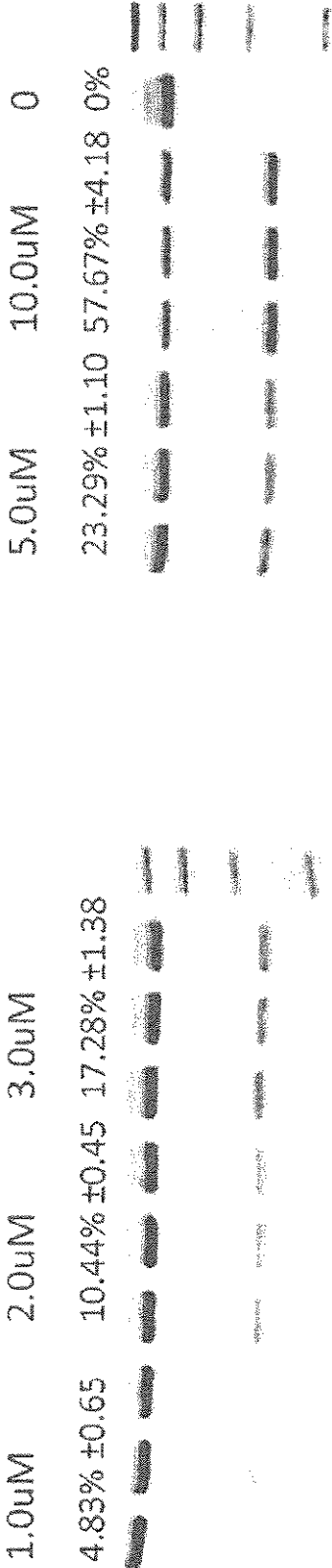


FIG. 4E

Exon 53 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0751 09AU11-J(E7) (SEQ ID NO: 431)

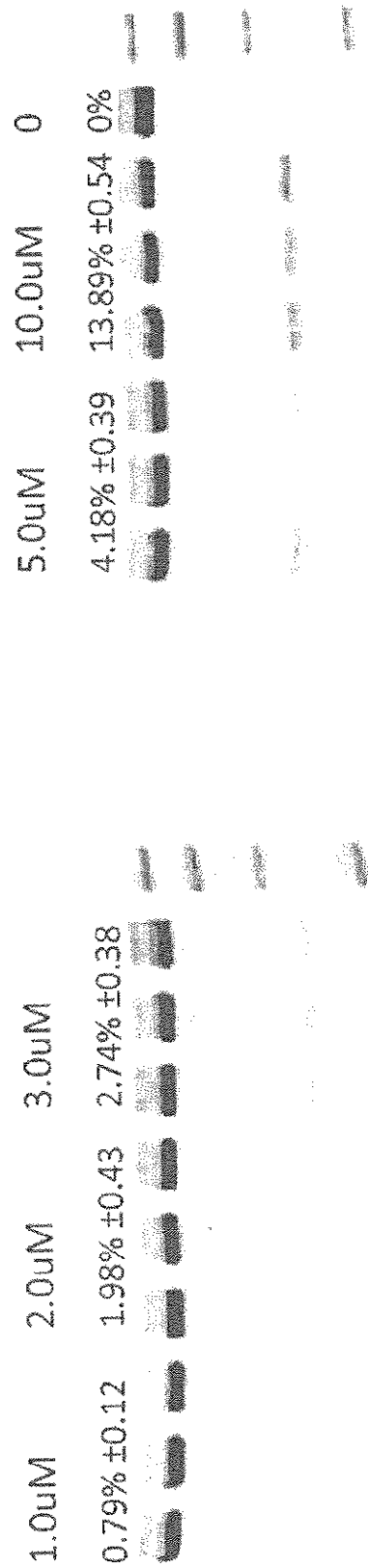


FIG. 4F

Sumário do Intervalo de Doses. Exon53 de Células RD

Exon Cento Ignorado

Tratamento (μM)	746 (SEQ ID NO:422)	749 (SEQ ID NO:428)	750 (SEQ ID NO:429)	751 (SEQ ID NO:431)
1.0	0.00	1.05	4.83	0.79
2.0	0.00	1.72	10.44	1.98
3.0	0.00	2.40	17.28	2.74
5.0	0.54	2.62	23.29	4.18
10	3.53	4.63	57.67	13.89

EC₅₀ (μM) NA 72.2 9.3 25.3

FIG. 4G

Exon 53 MCS (Tela Concorrente de Célula Muscular)

Síntese de Alta Pureza, 3,0 uM (Células Primárias do Músculo Esquelético Humano)

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

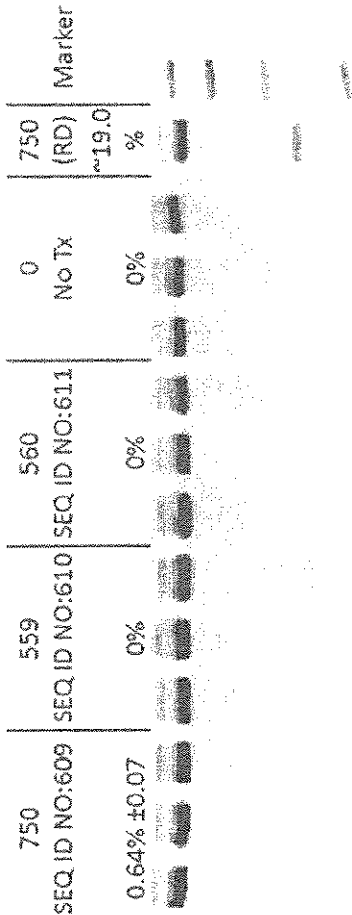


FIG. 4I

Scan Oligos de Exon 44 da Distrofina

DMD Gene 1756

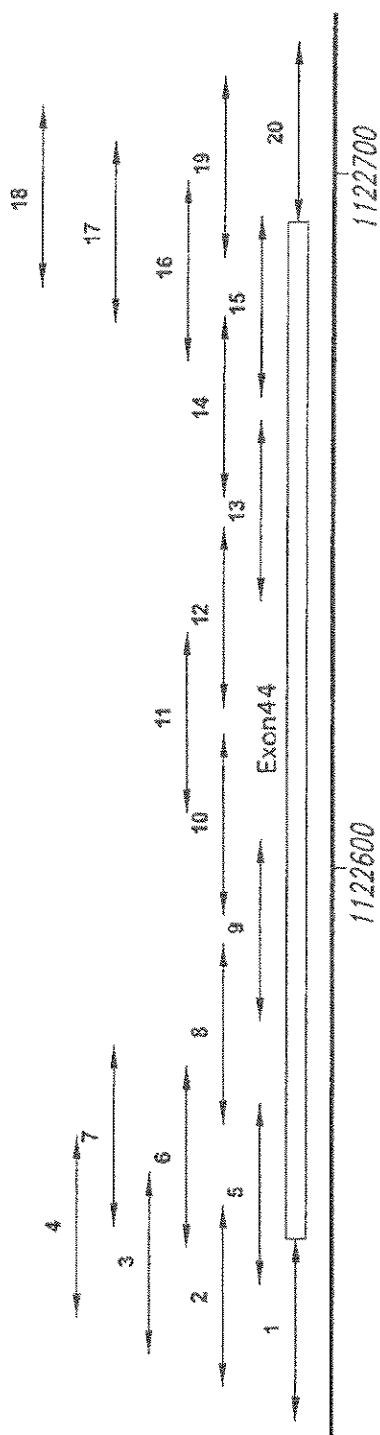


FIG. 5A

Exon 44 DR.2 (Intervalo de Dose)

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-08-0792 09AU11-J(A2) (SEQ ID NO: 4)

0.1uM	0.3uM	1.0uM	3.0uM	10.0uM	0
3.14% ±0.86	4.66% ±0.85	7.56% ±0.54	21.64% ±3.03	64.94% ±2.02	0%

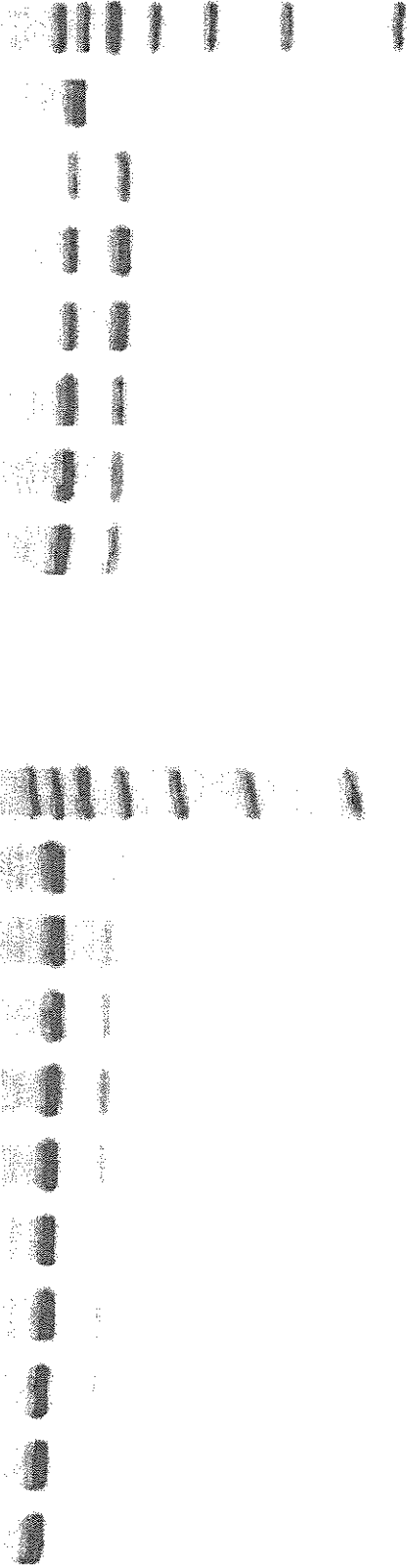


FIG. 5C

Exon 44 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-08-0796 09AU11-J(B2) (SEQ ID NO: 8)

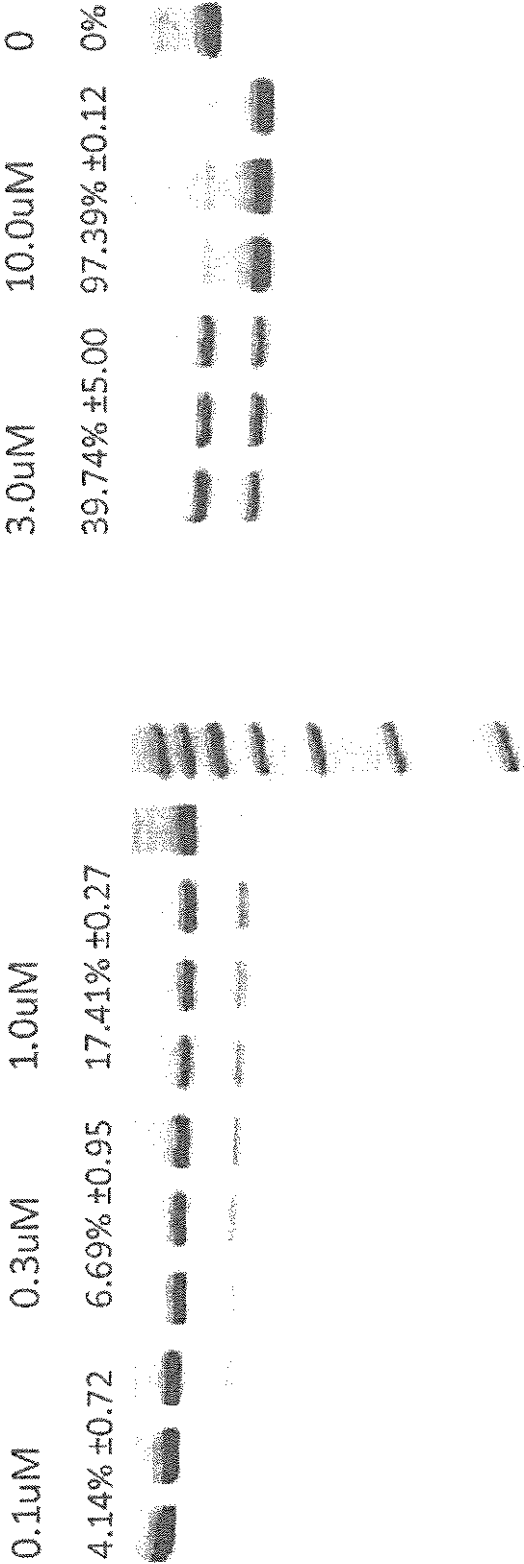


FIG. 5D

Exon 44 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-08-0799 09AU11-J(C2) (SEQ ID NO: 11)

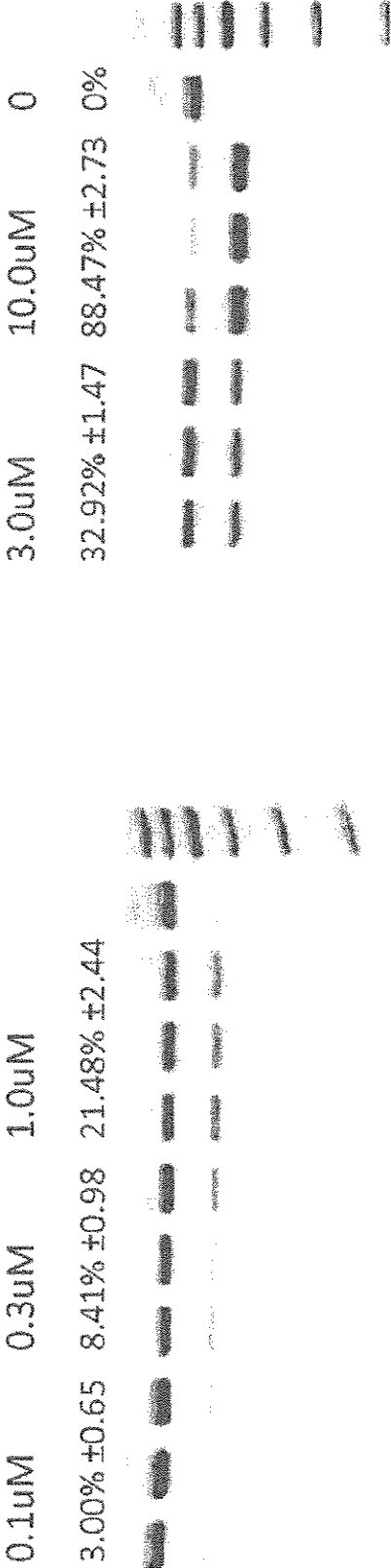


FIG. 5E

Exon 44 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-08-0800 09AU11-J(D2) (SEQ ID NO: 12)

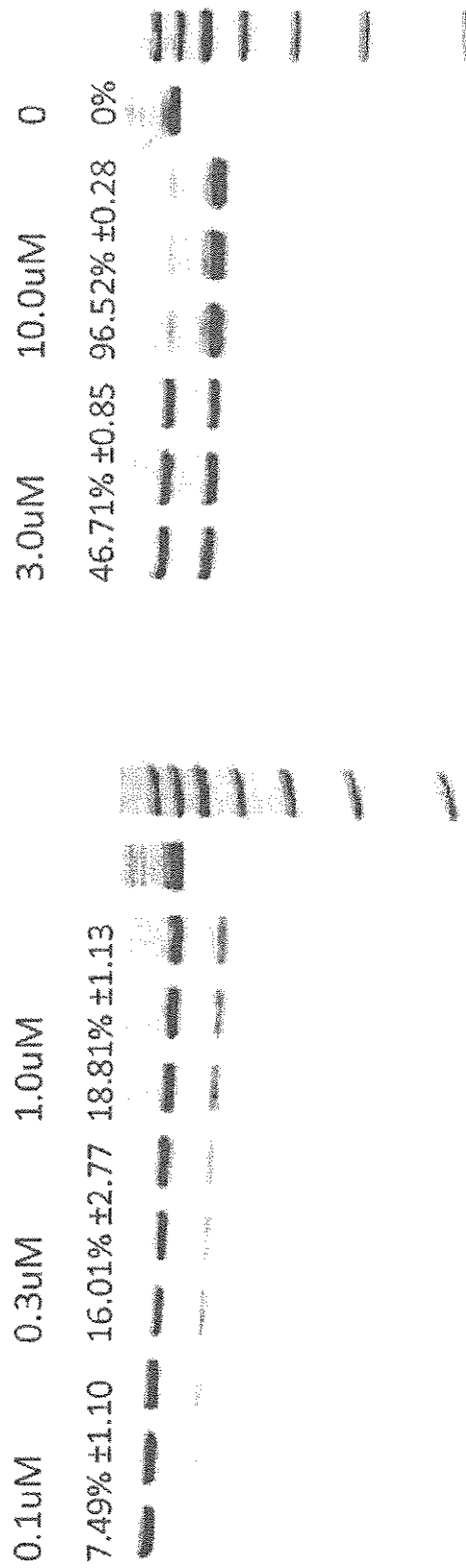


FIG. 5F

Exon 44 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0801 09AU11-J(E2) (SEQ ID NO: 13)

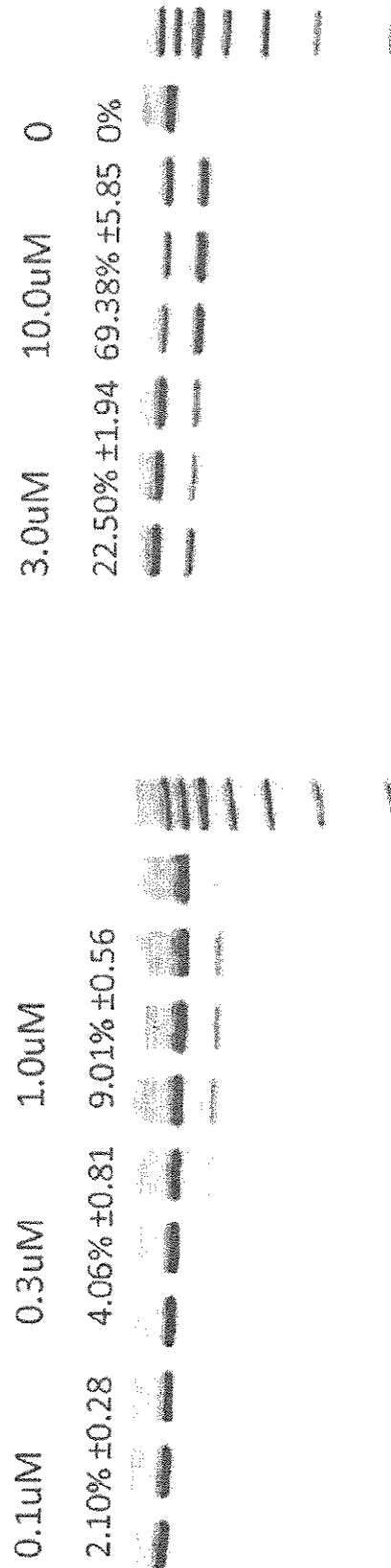


FIG. 5G

Exon 44 de Células RD. Sumário do Intervalo de Dose

Percentual de Salto de Éxon

Tratamento (uM)	792 (SEQ ID NO:4)	796 (SEQ ID NO:8)	799 (SEQ ID NO:11)	800 (SEQ ID NO:12)	801 (SEQ ID NO:13)
0.1	3.14	4.14	3.00	7.49	2.10
0.3	4.66	6.69	8.41	16.01	4.06
1	7.56	17.41	21.48	18.81	9.01
3	21.64	39.74	32.92	46.71	22.50
10	64.94	97.39	88.47	96.52	69.38
EC ₅₀ (uM)	7.166	3.024	3.594	2.795	6.277

FIG. 5H

Exon 44 CS (Tela Concorrente)

Síntese de Alta Pureza, 3,0 uM, Células RD


Oligo	Nome; Seq ID	Lote				
NG-09-0561	H44A(+61+84); 600	09AU18-J(E1)				
NG-09-0562	H44A(+85+104); 601	09AU18-J(F1)				
NG-09-0563	h44AON1; 602	09AU18-J(A2)				
NG-09-0564	H44A(-06+14); 603	09AU18-J(B2)				
NG-08-0800	012; 12	09AU11-J(D2)				
561	562	563	564	800		
SEQ ID NO: 800	SEQ ID NO: 602	SEQ ID NO: 563	SEQ ID NO: 564	SEQ ID NO: 800		
600	601	SEQ ID NO:12	NO:603	12		
				MW 0		
44.4% ±4.22	20.4% ±0.84	Not quantified	94.0% ±0.32	97.1% ±0.07	47.5% ±2.05	0%
						

FIG. 5I

Exon 44MCS (Tela Concorrente de Célula Muscular)

Síntese de Alta Pureza, 3,0uM (Células Primárias de Músculo Esquelético Hu-
mano

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

Inadequate NG-09-0564 to include in screen.

800	561	562	563	800	No tx	800 (RD)
8.86% ±0.57	2.13% ±0.75	0%	6.42% ±0.54	Not Quantified	0%	47.53% ±2.05

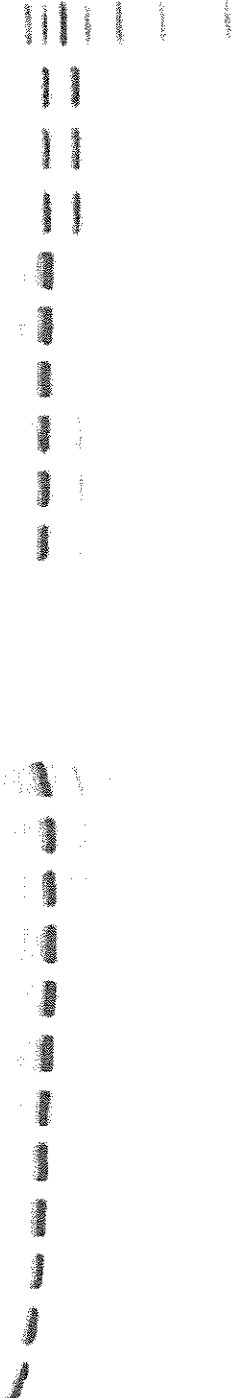


FIG. 5J

Scan Oligos de Exon 45 da Distro- fina

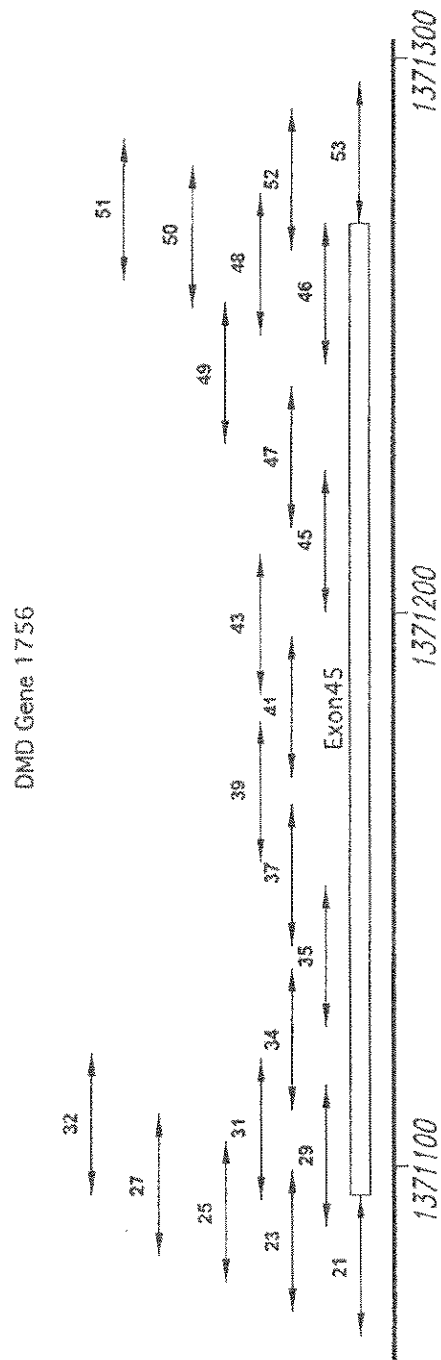


FIG. 6A

Scan Oligos Seleccionados de Exon 45 de Distro- fina

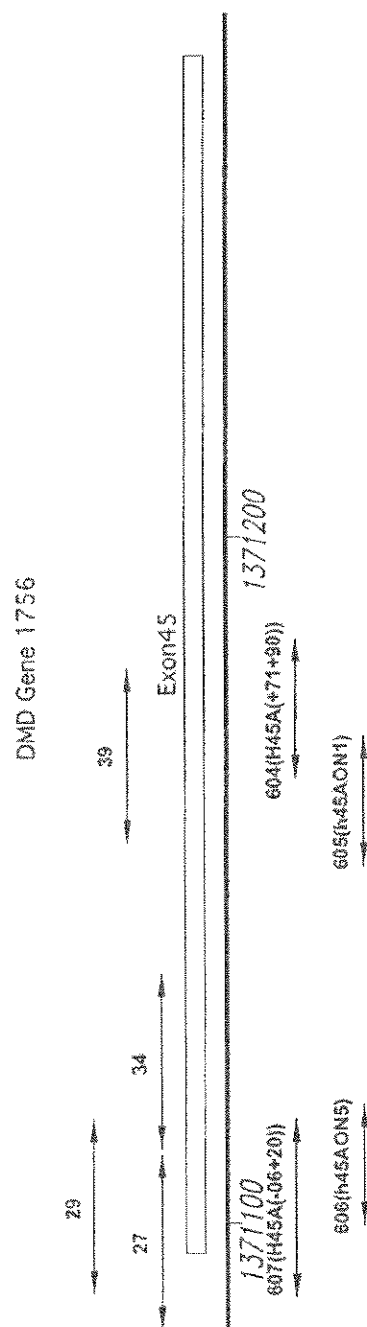


FIG. 6B

Exon 45 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0770 09AU11-J(F2) (SEQ ID NO: 27)

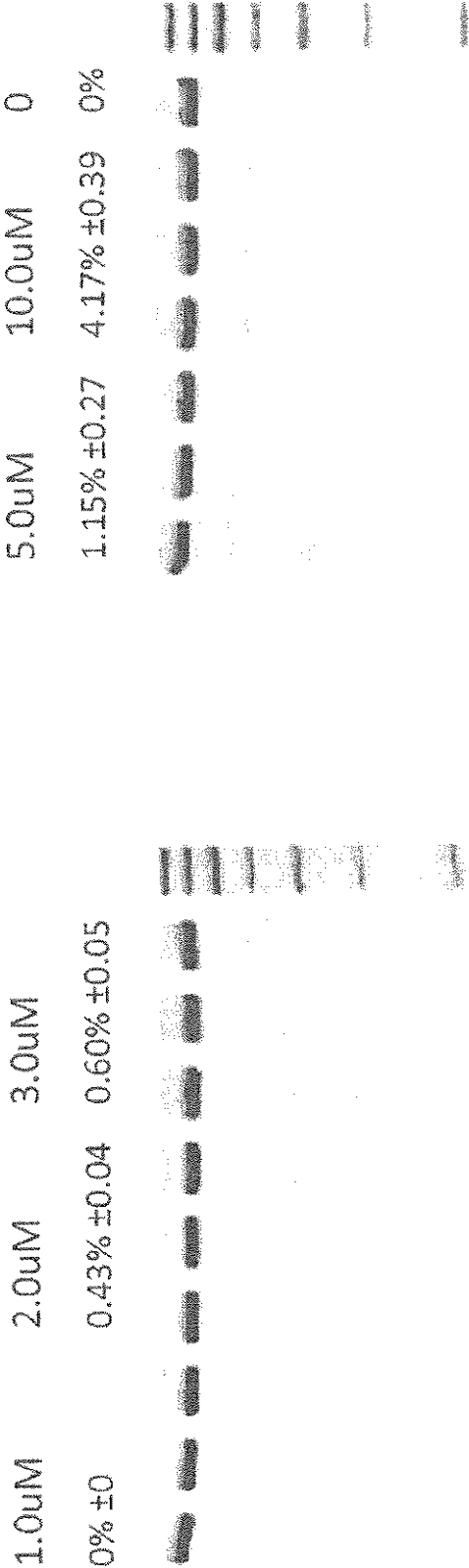


FIG. 6C

Exon 45 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0771 09AU11-J(A4) (SEQ ID NO: 29)

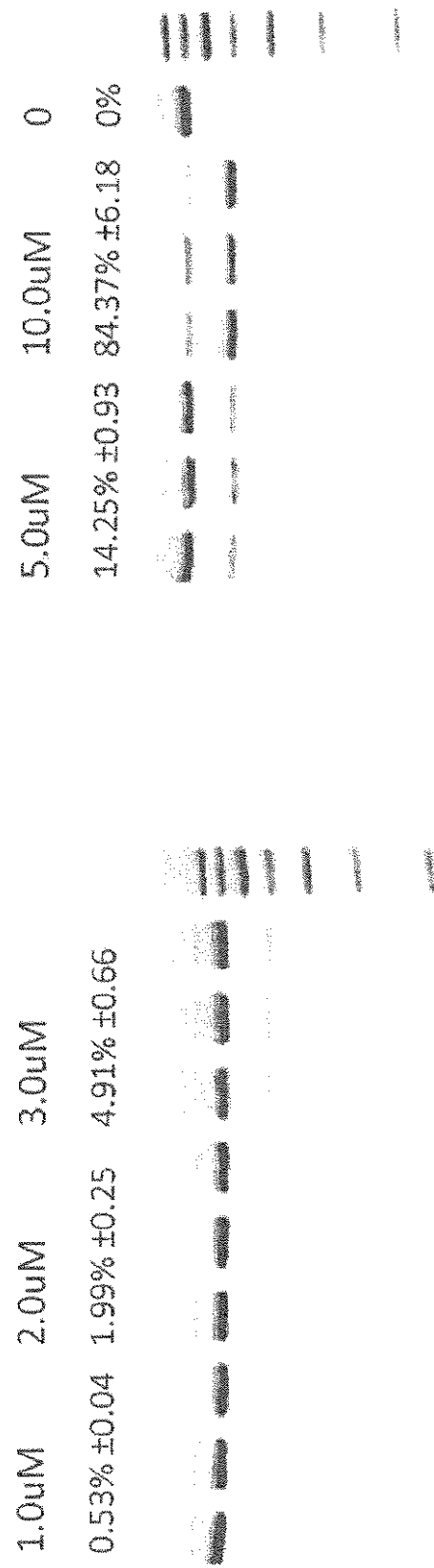


FIG. 6D

Exon 45 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0774 09AU11-J(B4) (SEQ ID NO: 34)

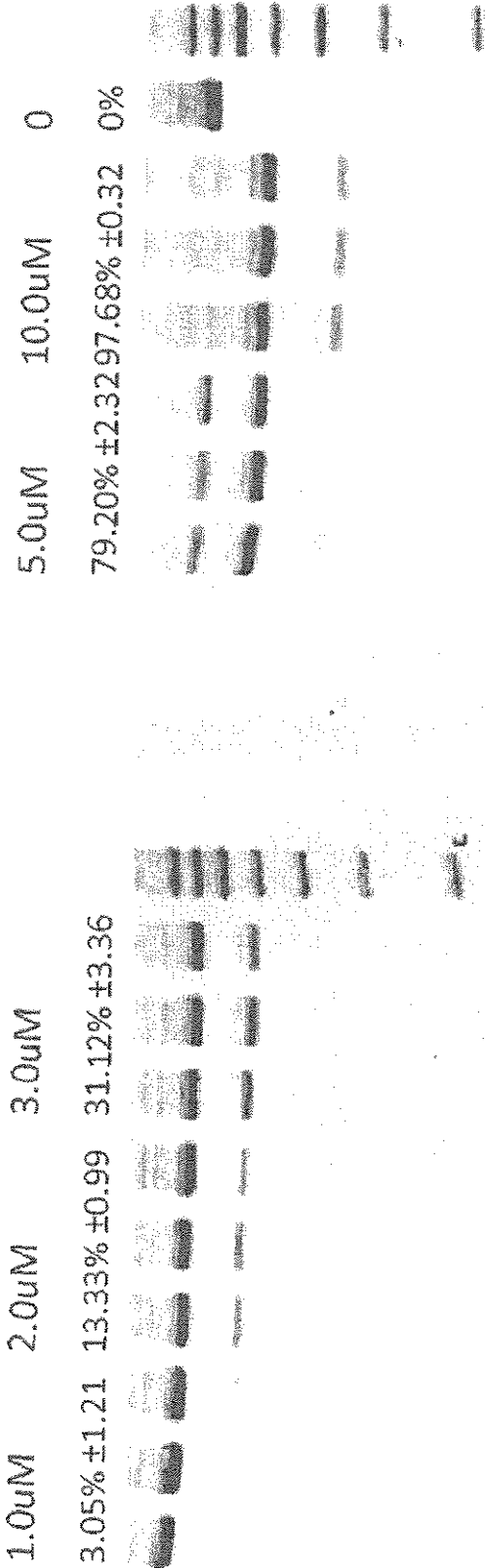


FIG. 6E

Exon 45 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

NG-0777 09AU11-J(C4) (SEQ ID NO: 39)

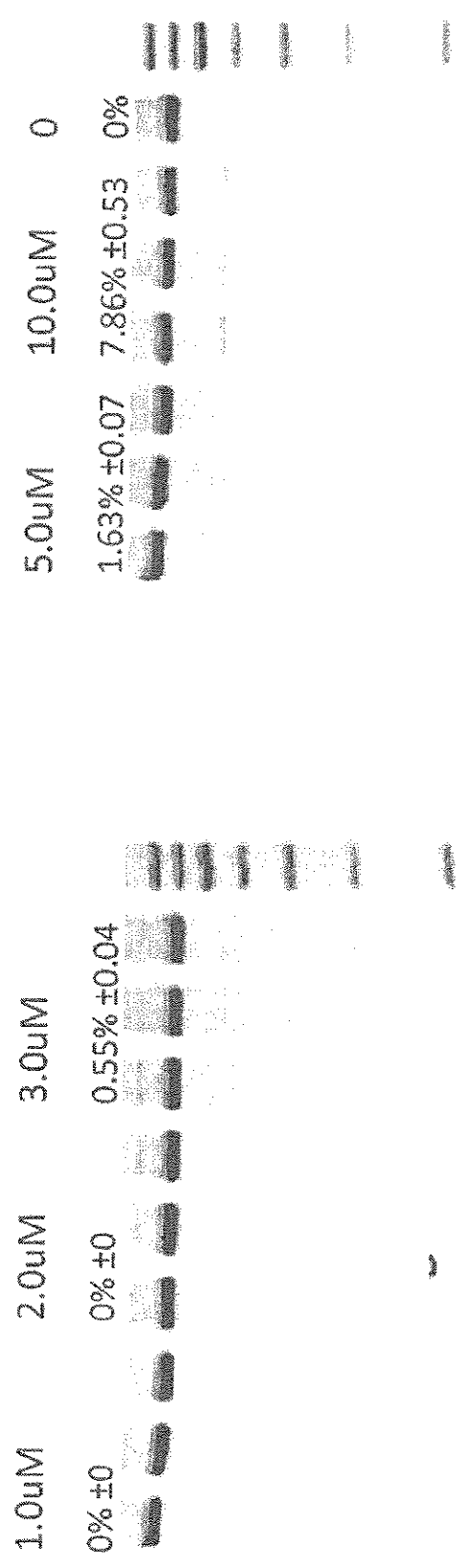


FIG. 6F

Exon 45 DR.2

Síntese de Alta Pureza, (1,0, 2,0, 3,0, 5,0, 10,0 uM) Células RD

(Controle negativo)

NG-0782 09AU11-J(D4) (SEQ ID NO: 49)

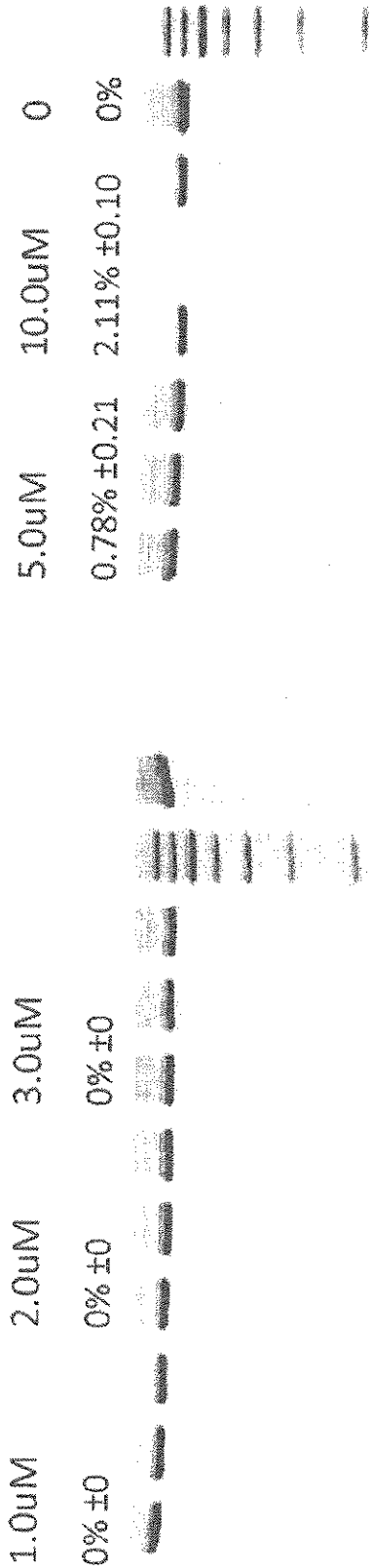


FIG. 6G

Exon 45 de Células RD. Sumário do Intervalo de Doses

Percentual de Salto de Éxon

Tratamento (uM)	770 (SEQ ID NO:27)	771 (SEQ ID NO:29)	774 (SEQ ID NO:34)	777 (SEQ ID NO:39)	782 (SEQ ID NO:49)
1.0	0.00	0.53	3.05	0.00	0.00
2.0	0.43	1.99	13.33	0.00	0.00
3.0	0.60	4.91	31.12	0.55	0.00
5.0	1.15	14.25	79.20	1.63	0.78
10	4.17	84.37	97.68	7.86	2.11
EC ₅₀ (uM)	54.37	7.25	3.69	NA	NA

FIG. 6H

Exon 45MCS (Tela Concorrente de Célula Muscular)

Síntese de Alta Pureza, 3,0 uM (Células Primárias de Músculo Esquelético Humano)

<u>Oligo</u>	Nome; <u>SEQ ID</u>	Lote
NG-09-0565	H45A(+71+90); 604	09AU18-J(C2)
NG-09-0566	h45AON1; 605	09AU18-J(D2)
NG-09-0567	h45AON5; 606	09AU18-J(E2)
NG-09-0568	H45A(-06+20); 607	09AU18-J(F2)
NG-08-0774	008; 34	09AU11-J(B4)

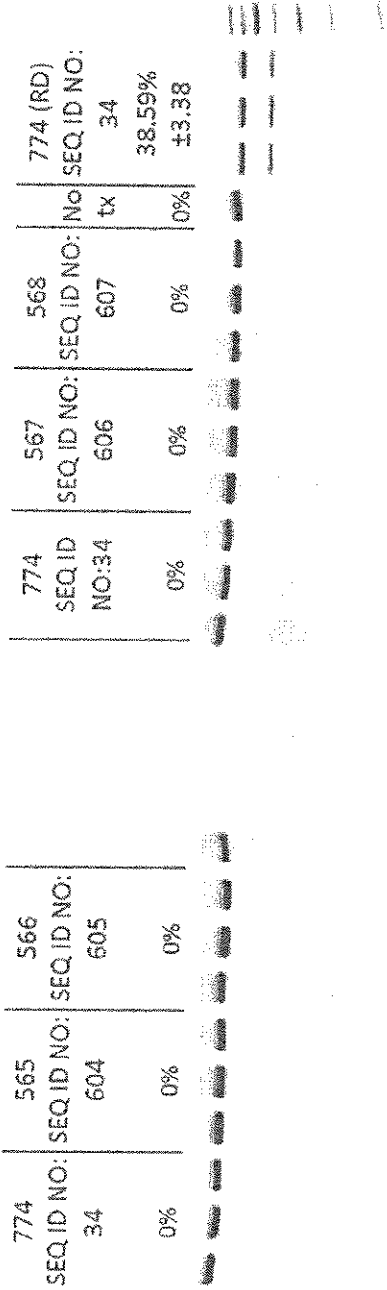


FIG. 6J