

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 980 686**

(51) Int. Cl.:

**A61K 47/64** (2007.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2017 E 22180767 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2024 EP 4122497**

(54) Título: **Conjugados de oligómero de omisión de exones para distrofia muscular**

(30) Prioridad:

19.12.2016 US 201662436199 P  
06.01.2017 US 201762443481 P  
30.03.2017 US 201762479177 P  
22.09.2017 US 201762562119 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.10.2024**

(73) Titular/es:

**SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)**  
215 First Street, Suite 415  
Cambridge, MA 02142, US

(72) Inventor/es:

**PASSINI, MARCO, A. y  
HANSON, GUNNAR, J.**

(74) Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 2 980 686 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Conjugados de oligómero de omisión de exones para distrofia muscular

5 Información relacionada

La presente solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con el Nº de serie 62/436,199 presentada el 19 de diciembre de 2016, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con el Nº de serie 62/443,481, presentada el 6 de enero de 2017, la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con el Nº de serie 62/479,177, presentada el 30 de marzo de 2017, y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos con el Nº de serie 62/562,119, presentada el 22 de septiembre de 2017.

Campo de la divulgación

15 La presente divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido para su uso en la inducción de la omisión del exón 45, produciendo distrofina en un sujeto que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45 y el tratamiento de un sujeto que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

20 Antecedentes de la divulgación

Se están desarrollando tecnologías antisentido utilizando una diversidad de productos químicos para afectar a la expresión génica en una variedad de niveles diferentes (transcripción, empalme, estabilidad, traducción). Gran parte de esa investigación se ha centrado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar genes anormales o asociados a enfermedades en un amplio abanico de indicaciones. Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad y, debido a esto, muchos esfuerzos de investigación relacionados con los oligómeros como moduladores de la expresión génica se han centrado en inhibir la expresión de genes diana o la función de elementos que actúan en cis. Los oligómeros antisentido se dirigen generalmente contra el ARN, ya sea la cadena sentido (por ejemplo, ARNm) o la cadena negativa en el caso de algunas dianas de ARN vírico. Para lograr el efecto deseado de regulación a la baja de un gen específico, los oligómeros generalmente promueven la degradación del ARNm diana, bloquean la traducción del ARNm o bloquean la función de los elementos del ARN que actúan en cis, evitando así de forma eficaz la síntesis *de novo* de la proteína diana o la replicación del ARN vírico.

35 Sin embargo, dichas técnicas no son útiles cuando el objetivo es regular al alza la producción de la proteína nativa o compensar las mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tales como mutaciones sin sentido o de desplazamiento de marco. En estos casos, el transcripto del gen defectuoso no debe someterse a degradación dirigida o inhibición estérica, por lo que la química del oligómero antisentido no debe promover la degradación del ARNm diana ni bloquear la traducción.

40 En una diversidad de enfermedades genéticas, los efectos de las mutaciones sobre la expresión eventual de un gen se pueden modular a través de un proceso de omisión del exón diana durante el proceso de empalme. El proceso de empalme está dirigido por una maquinaria compleja de múltiples componentes que acerca las uniones exón-intrón adyacentes en el pre-ARNm hasta una estrecha proximidad y realiza la escisión de enlaces fosfodiéster en los extremos de los intrones con su posterior reforma entre los exones que se van a empalmar entre sí. Este proceso complejo y altamente preciso está mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm que son segmentos de ARN semiconservados relativamente cortos a los que se unen varios factores de empalme nuclear que están involucrados después en las reacciones de empalme. Mediante un cambio en la manera en que la maquinaria de empalme lee o reconoce los motivos involucrados en el procesamiento de pre-ARNm es posible crear moléculas de ARNm empalmadas diferencialmente. Se ha reconocido actualmente que la mayor parte de los genes humanos se empalman alternativamente durante la expresión génica normal, aunque no se han identificado los mecanismos involucrados. Bennett et al. (patente de Estados Unidos Nº 6.210.892) describen la modulación antisentido del procesamiento de ARNm celular de tipo silvestre utilizando análogos de oligómeros antisentido que no inducen la escisión del ARN diana mediada por ARNasa H. Esto resulta útil para poder generar ARNm empalmados alternativamente que carecen de exones específicos (véase, por ejemplo, como se describe por Sazani, Kole, et al., 2007, para la generación de receptores de la superfamilia de TNF solubles que carecen de exones que codifican dominios distribuidos por toda la extensión de la membrana).

60 En los casos en los que una proteína normalmente funcional se termina prematuramente debido a mutaciones en la misma, se ha demostrado que es posible un medio para restaurar cierta cantidad de la producción de la proteína funcional por medio de tecnología antisentido mediante la intervención durante los procesos de empalme, y que si los exones asociados con mutaciones causantes de enfermedades pueden eliminarse específicamente de algunos genes, a veces puede producirse un producto proteico acortado que tiene propiedades biológicas similares a la proteína nativa o tiene suficiente actividad biológica como para mejorar la enfermedad provocada por mutaciones asociadas con el exón (véanse, por ejemplo, Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004). Kole et al. (patentes de Estados Unidos Nº 5.627.274, 5.916.808, 5.976.879 y 5.665.593) divulgan procedimientos para combatir el empalme anómalo utilizando

análogos de oligómeros antisentido modificados que no promueven la degradación del pre-ARNm diana. Bennett et al. (patente de Estados Unidos Nº 6,210,892) describen la modulación antisentido del procesamiento de ARNm celular de tipo silvestre utilizando también análogos de oligómeros antisentido que no inducen la escisión del ARN diana mediada por ARNasa H.

- 5 Es probable que el proceso de omisión del exón diana sea particularmente útil en genes largos en los que hay presencia de muchos exones e intrones, en los que hay redundancia en la constitución genética de los exones o en los que una proteína es capaz de funcionar sin uno o más exones particulares. Los esfuerzos para redirigir el procesamiento de genes para el tratamiento de enfermedades genéticas asociadas con truncamientos provocados por mutaciones en diversos genes se han centrado en el uso de oligómeros antisentido que: (1) se superponen totalmente o parcialmente con los elementos involucrados en el proceso de empalme; o (2) se unen al pre-ARNm en una posición suficientemente cercana al elemento para alterar la unión y la función de los factores de empalme que normalmente mediarían en una reacción de empalme particular que tenga lugar en ese elemento.
- 10 15 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) está provocada por un defecto en la expresión de la proteína distrofina. El gen que codifica la proteína contiene 79 exones distribuidos en más de 2 millones de nucleótidos de ADN. Cualquier mutación exónica que cambie el marco de lectura del exón, o introduzca un codón de detección, o se caracterice por la eliminación de un exón o exones totalmente fuera de marco, o duplicaciones de uno o más exones, tiene el potencial de alterar la producción de distrofina funcional, lo que da como resultado DMD.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 Se ha descubierto que una forma menos grave de distrofia muscular, la distrofia muscular de Becker (BMD), se produce cuando una mutación, generalmente una delección de uno o más exones, da como resultado un marco de lectura correcto a lo largo de la totalidad del transcripto de distrofina, de modo que la traducción del ARNm en proteína no se termina prematuramente. Si la unión de los exones cadena arriba y cadena abajo en el procesamiento de un pre-ARNm de distrofina mutado mantiene el marco de lectura correcto del gen, el resultado es un ARNm que codifica una proteína con una delección interna corta que conserva una cierta actividad, lo que da como resultado un fenotipo de Becker.
- Durante muchos años se ha sabido que las delecciones de un exón o exones que no alteran el marco de lectura de una proteína distrofina darían lugar a un fenotipo de BMD, mientras que una delección exónica que provoca un desplazamiento de marco dará lugar a DMD (Monaco, Bertelson et al., 1988). En general, las mutaciones de distrofina, incluidas las mutaciones puntuales y las delecciones exónicas que cambian el marco de lectura y, por lo tanto, interrumpen la traducción adecuada de la proteína, dan como resultado DMD. También se debe tener en cuenta que algunos pacientes con BMD y DMD tienen delecciones exónicas que abarcan múltiples exones.
- Se ha informado de la modulación del empalme de pre-ARNm de distrofina mutante con oligorribonucleótidos antisentido tanto *in vitro* como *in vivo* (véase, por ejemplo, Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Wilton, Lloyd et al. 1999; Mann, Honeyman et al. 2002; Errington, Mann et al. 2003).
- Los oligómeros antisentido se han diseñado específicamente para que se dirijan a regiones específicas del pre-ARNm, generalmente exones para inducir la omisión de una mutación del gen DMD, restaurando así estas mutaciones fuera de marco en el marco para permitir la producción proteína distrofina acortada internamente pero funcional. Se sabe que dichos oligómeros antisentido se dirigen completamente al interior del exón (las denominadas secuencias internas del exón) o a una unión de donante de empalme o de aceptor de empalme que cruza desde el exón a una porción del intrón.
- El descubrimiento y desarrollo de dichos oligómeros antisentido para DMD ha sido un área de investigación previa. Estos desarrollos incluyen los de: (1) la University of Western Australia y Sarepta Therapeutics (cesionario de la presente solicitud): documentos WO 2006/000057; WO 2010/048586; WO 2011/057350; WO 2014/100714; WO 2014/153240; WO 2014/153220; (2) Academisch Ziekenhuis Leiden/Prosensa Technologies (ahora BioMarin Pharmaceutical): documentos WO 02/24906; WO 2004/083432; WO 2004/083446; WO 2006/112705; WO 2007/133105; WO 2009/139630; WO 2009/054725; WO 2010/050801; WO 2010/050802; WO 2010/123369; WO 2013/112053; WO 2014/007620; (3) Carolinas Medical Center: documento WO 2012/109296; (4) Royal Holloway: patentes y solicitudes que reivindican el beneficio de, y que incluyen, aquellas con el Nº de serie de Estados Unidos 61/096.073 y 61/164.978; tales como los documentos US 8.084.601 y US 2017-0204413 (4) JCR Pharmaceuticals and Matsuo: documento US 6.653.466; patentes y solicitudes que reivindican el beneficio de, y que incluyen, el documento JP 2000-125448, tal como el documento US 6.653.467; patentes y solicitudes que reivindican el beneficio de, y que incluyen, el documento JP 2000-256547, tal como US 6,727,355; WO 2004/048570; (5) Nippon Shinyaku: documentos WO 2012/029986, WO 2013/100190, WO 2015/137409, WO 2015/194520; y (6) Association Institut de Myologie/Université Pierre et Marie Curie/Universität Bern/Centre national de la Recherche Scientifique/Synthena AG: documentos WO 2010/115993, WO 2013/053928.
- El descubrimiento y desarrollo de oligómeros antisentido conjugados con péptidos de penetración celular para la DMD también ha sido un área de investigación (véanse la publicación PCT Nº WO 2010/048586; Wu, B. et al., The American Journal of Pathology, vol. 181 (2): 392-400, 2012; Wu, R. et al., Nucleic Acids Research, vol. 35 (15): 5182-5191, 2007;

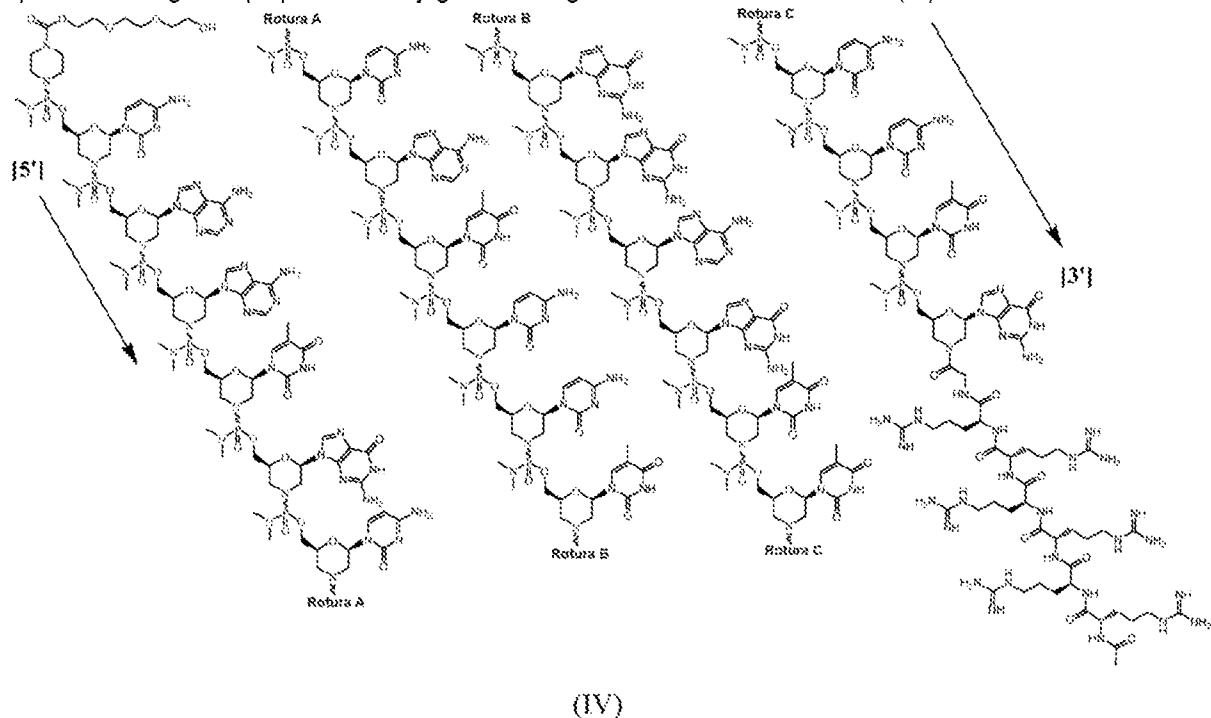
Mulders, S. et al., 19º Congreso Internacional de la World Muscle Society, Poster Presentation Berlin, octubre de 2014; Bestas, B. et al., The Journal of Clinical Investigation, doi: 10.1172/JCI76175, 2014; Jearawiriyapaisarn, N. et al., Molecular Therapy, Vol. 16(9): 1624-1629, 2008; Jearawiriyapaisarn, N. et al., Cardiovascular Research, vol. 85: 444-453, 2010; Moulton, H.M. et al., Biochemical Society Transactions, vol. 35 (4): 826-828, 2007; Yin, H. et al., Molecular Therapy, Vol. 19 (7): 1295-1303, 2011; Abes, R. et al., J. Pept. Sci., vol. 14: 455-460, 2008; Lebleu, B. et al., Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 60: 517-529, 2008; McClorey, G. et al., Gene Therapy, vol. 13: 1373-1381, 2006; Alter, J. et al., Nature Medicine, Vol. 12 (2): 175-177, 2006; y Youngblood, D. et al., American Chemical Society, Bioconjugate Chem., 2007, 18 (1), páginas 50-60). Además, el documento WO 2012/150960 divulga análogos de oligonucleótidos conjugados con péptidos portadores. Los conjugados divulgados se describen como útiles para el tratamiento de diversas enfermedades, por ejemplo, enfermedades en las que la inhibición de la expresión de proteínas o la corrección de productos de corte y empalme de ARNm aberrantes produce efectos terapéuticos beneficiosos.

Los péptidos de penetración celular (CPP), por ejemplo un resto de transporte de péptido rico en arginina, pueden ser eficaces para mejorar la penetración de, por ejemplo, un oligómero antisentido conjugado con el CPP, en una célula.

A pesar de estos esfuerzos, sigue existiendo la necesidad de oligómeros antisentido mejorados que se dirijan al exón 45 y de composiciones farmacéuticas correspondientes que sean potencialmente útiles para procedimientos terapéuticos para la producción de distrofina y el tratamiento de la DMD.

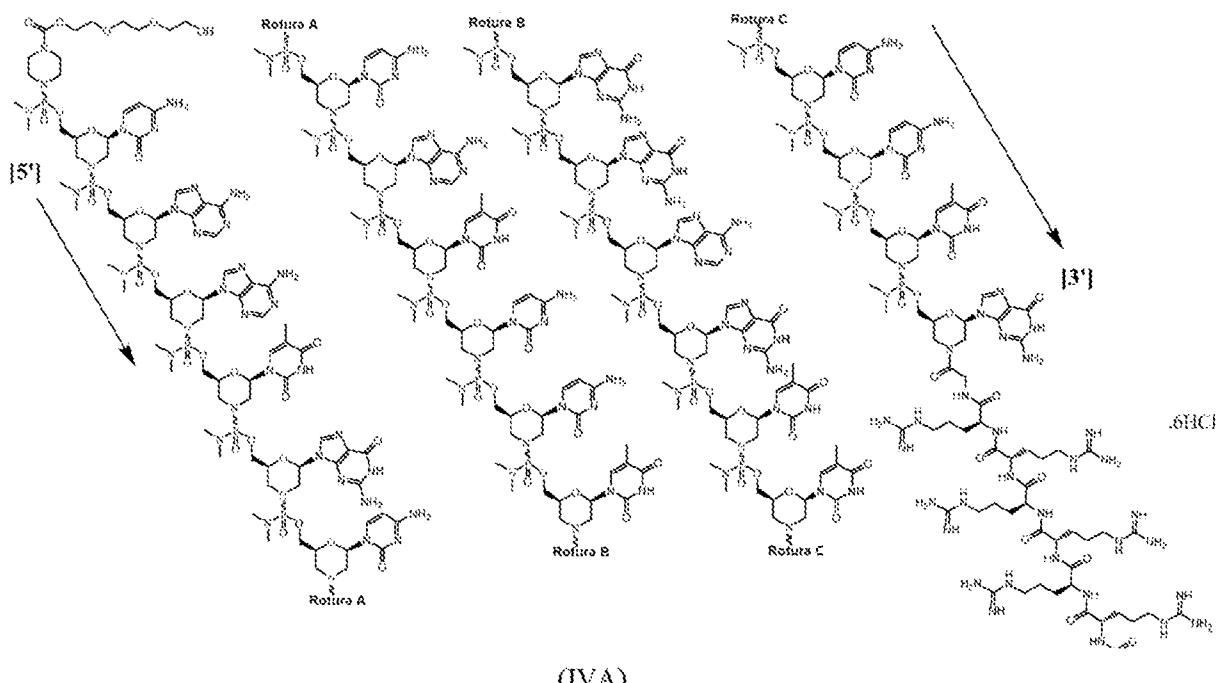
## 20 Sumario de la divulgación

La presente divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido de fórmula (IV):



25 o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto primate que lo necesite, en donde el sujeto primate tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

En otro aspecto, la divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido de fórmula (IVA):



para los usos divulgados en la presente.

En otro aspecto, la divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de un oligómero antisentido de Fórmula (IV) o (IVA), y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la omisión del exón 45 para el pre-ARNm de distrofina durante el procesamiento del ARNm en un sujeto primate que tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un conjugado de un oligómero antisentido de Fórmula (IV) o (IVA) para su uso en un procedimiento para la restauración de un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de distrofina en un sujeto primate que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45. En otro aspecto, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un oligómero antisentido de Fórmula (IV) o (IVA) para su uso en la unión al exón 45 del pre-ARNm de distrofina en un sujeto primate que tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

15 Estos y otros objetos y características se entenderán mejor cuando se lea la siguiente descripción detallada de la divulgación junto con las figuras.

### Breve descripción de las figuras

Breve descripción de las figuras

La figura 2 muestra una sección de pre-ARNm de distrofina anormal (ejemplo de DMD) y distrofina inestable no

La figura 3 (no forma parte de la presente invención) representa eteplirsén, diseñado para omitir el exón 45, restauración de la lectura "long reading" de los ARNms para producir distintos tipos de la misma蛋ntrona.

30 Las figuras 4A-4D (no forman parte de la presente invención) proporcionan imágenes representativas del análisis por immunotransferencia Western que mide la proteína distrofina en los cuádriceps de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes puntos temporales [7 días (5A), 30 días (5B), 60 días (5C) y 90 días (5D)].

La figura 5A (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico lineal que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en los cuádriceps de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante análisis por inmunotransferencia Western.

La figura 5B (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico lineal que representa el porcentaje de omisión del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en los cuádriceps de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado por RT-PCR.

Las figuras 6A-6D (no forman parte de la presente invención) proporcionan imágenes representativas del análisis por

inmunotransferencia Western que mide la proteína distrofina en el diafragma de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes puntos temporales [7 días (7A), 30 días (7B), 60 días (7C) y 90 días (7D)].

- 5 La figura 7A (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico lineal que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante análisis por inmunotransferencia Western.
- 10 La figura 7B (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico lineal que representa el porcentaje de omisión del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado por RT-PCR.
- 15 Las figuras 8A-8D (no forman parte de la presente invención) proporcionan imágenes representativas del análisis por inmunotransferencia Western que mide la proteína distrofina en el corazón de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes puntos temporales [7 días (9A), 30 días (9B), 60 días (9C) y 90 días (9D)].
- 20 La figura 9A (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico lineal que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado mediante análisis por inmunotransferencia Western.
- 25 La figura 9B (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico lineal que representa el porcentaje de omisión del exón 23 inducido por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de ratones mdx a lo largo de 90 días después de la inyección, determinado por RT-PCR.
- 30 La figura 10 (no forma parte de la presente invención) proporciona un análisis inmunohistoquímico que muestra la distrofina en el cuádriceps izquierdo de ratón mdx inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225).
- 35 Las figuras 11A-B (no forman parte de la presente invención) proporcionan imágenes representativas del análisis por inmunotransferencia Western que mide la proteína distrofina en el corazón de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.
- 40 La figura 12 (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el corazón de ratones mdx determinado mediante análisis por inmunotransferencia Western 30 días después de la inyección a diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.
- 45 Las figuras 13A-B (no forman parte de la presente invención) proporcionan imágenes representativas del análisis por inmunotransferencia Western que mide la proteína distrofina en el diafragma de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) para diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.
- 50 La figura 14 (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en el diafragma de ratones mdx determinado mediante análisis por inmunotransferencia Western 30 días después de la inyección a diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.
- 55 Las figuras 15A-B (no forman parte de la presente invención) proporcionan imágenes representativas del análisis por inmunotransferencia Western que mide la proteína distrofina en los cuádriceps de ratones mdx tratados con PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) a diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.
- 60 La figura 16 (no forma parte de la presente invención) proporciona un gráfico de barras que representa el porcentaje de distrofina de tipo silvestre inducida por PMO (PMO4225) o PPMO (PPMO4225) en los cuádriceps de ratones mdx determinado mediante análisis por inmunotransferencia Western 30 días después de la inyección a diferentes dosis: 40 mg/kg, 80 mg/kg y 120 mg/kg.
- 65 La figura 17 muestra los ciclos de acoplamiento realizados por el procedimiento B de síntesis de PMO.
- La figura 18 (no forma parte de la presente invención) proporciona un análisis inmunohistoquímico que muestra la distrofina y la laminina en el diafragma y el corazón de ratones mdx inducidas por PPMO (PPMO4225) en comparación con una solución salina en ratones mdx y ratones de tipo silvestre.
- La figura 19 proporciona un gráfico de barras del porcentaje de omisión del exón 45 en mioblastos humanos sanos por PMO#1 y PPMO#1 a varias concentraciones 96 horas después del tratamiento, medido por RT-PCR. Las barras de error representan la media ± SD. El número x denota el cambio de pliegues relativo en el porcentaje de omisión de exón por PPMO#1 en comparación con PMO#1 en cada concentración. \*, \*\*, \*\*\* e indican una diferencia significativa entre PMO#1 y PPMO#1 con un valor p < 0,05, 0,005 y 0,0005, respectivamente.

La figura 20 proporciona un gráfico de barras del porcentaje de omisión del exón 45 en miotubos humanos sanos por PMO#1 y PPMO#1 a varias concentraciones 96 horas después del tratamiento, medido por RT-PCR. Las barras de error representan la media ± SD. El número x denota el cambio de pliegues relativo en el porcentaje de omisión de exón por PPMO#1 en comparación con PMO#1 en cada concentración. \*\*, \*\*\* e indican una diferencia significativa entre PMO#1 y PPMO#1 con un valor p < 0,005 y 0,0001, respectivamente.

5

#### Descripción detallada de la divulgación

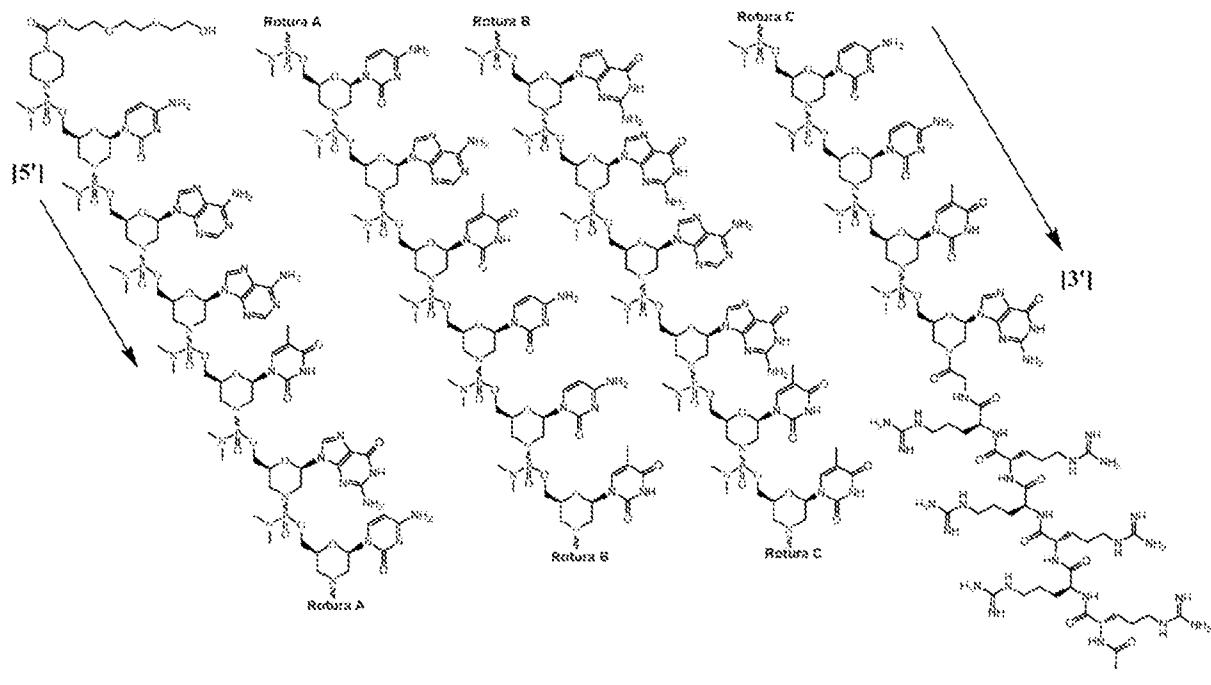
10 Las formas de realización de la presente divulgación se refieren en general a usos de conjugados de oligómero antisentido mejorados, que están específicamente diseñados para inducir la omisión de exones en el gen de la distrofina humana. La distrofina desempeña un papel vital en la función muscular, y varias enfermedades relacionadas con los músculos se caracterizan por formas mutadas de este gen. Por lo tanto, en determinadas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido mejorados descritos en el presente documento inducen la omisión de exones en formas mutadas del gen de la distrofina humana, tales como los genes de distrofina mutados que se encuentran en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD).

15 Debido a eventos anómalos de empalme de ARNm provocados por mutaciones, estos genes de la distrofina humana mutados expresan una proteína distrofina defectuosa o no expresan de ningún modo una distrofina medible, una afección que da lugar a diversas formas de distrofia muscular. Para remediar esta afección, los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación se hibridan con regiones seleccionadas de un ARNm preprocesado de un gen de la distrofina humana mutado, inducen la omisión de exones y el empalme diferencial en ese ARNm de distrofina que de otro modo se empalmaría de forma anómala y, por lo tanto, permiten que las células musculares produzcan una transcripto de ARNm que codifica una proteína distrofina funcional. En determinadas formas de realización, la proteína distrofina resultante no es necesariamente la forma de distrofina de tipo silvestre, sino más bien una forma de distrofina truncada, pero funcional.

20 Al aumentar los niveles de proteína distrofina funcional en las células musculares, estas y otras formas de realización relacionadas son útiles en la prevención y el tratamiento de la distrofia muscular, especialmente aquellas formas de distrofia muscular, tales como DMD y BMD, que se caracterizan por la expresión de proteínas de distrofina defectuosas debido al empalme anómalo de ARNm. Los conjugados de oligómero antisentido específicos descritos en el presente documento proporcionan además un direccionamiento específico a exones de distrofina mejorado con respecto a otros oligómeros y, por lo tanto, ofrecen ventajas significativas y prácticas con respecto a tratamientos alternativos de distrofia muscular.

25

30 35 Por lo tanto, la divulgación se refiere a un conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV)



40 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne

(DMD) en un sujeto primate que lo necesite, en donde el sujeto primate tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45..

- 5 La divulgación también se refiere a un conjugado de un oligómero antisentido de Fórmula (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un procedimiento para la restauración de un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de distrofina en un sujeto primate que tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.
- 10 La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un oligómero antisentido de Fórmula (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la exclusión del exón 45 del pre-ARNm de distrofina durante el procesamiento del ARNm en un sujeto primate que tiene una mutación en un gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.
- 15 La divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un oligómero antisentido de Fórmula (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la unión al exón 45 del pre-ARNm de distrofina en un sujeto primate que tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.
- 20 A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden comúnmente los expertos en la técnica a la que pertenece la divulgación. Aunque puede usarse cualquier procedimiento y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la puesta en práctica o el ensayo de la presente divulgación, se describen procedimientos y materiales preferidos. Para los fines de la presente divulgación, se definen a continuación los términos siguientes.
- 25 I. Definiciones
- Por "aproximadamente" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía como máximo el 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.
- 30 Se pretende que "sensible a la omisión del exón 45", tal como se utiliza en el presente documento con respecto a un sujeto o paciente, incluya sujetos y pacientes que tienen una o más mutaciones en el gen de la distrofina que, en ausencia de la omisión del exón 45 del pre-ARNm de la distrofina, provocan que el marco de lectura se encuentre fuera de marco, alterando así la traducción del pre-ARNm, lo que da lugar a una incapacidad del sujeto o paciente para producir distrofina funcional o semifuncional. Los ejemplos de mutaciones en el gen de la distrofina que son susceptibles a la omisión del exón 45 incluyen, por ejemplo, mutaciones en los exones 7-44, 12-44, 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, 46-55, 46-57, 46-59, 46-60, 46-67, 46-69, 46-75 y 46-78 (base de datos de mutaciones de distrofia muscular de Leiden Duchenne, Leiden University Medical Center, Países Bajos). La determinación de si un paciente tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión de exones se encuentra dentro de la competencia de un experto en la técnica (véanse, por ejemplo, Artsma-Rus et al. (2009) Hum Mutat. 30:293-299; Gurvich et al., Hum Mutat. 2009; 30(4) 633-640; y Fletcher et al. (2010) Molecular Therapy 18(6) 1218-1223.).
- 45 El término "oligómero", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a una secuencia de subunidades conectadas por enlaces entre subunidades. En determinados casos, el término "oligómero" se utiliza con referencia a un "oligómero antisentido". Para los "oligómeros antisentido", cada subunidad consiste en: (i) un azúcar de ribosa o un derivado del mismo; y (ii) una nucleobase unida al mismo, de modo que el orden de los restos de emparejamiento de bases forme una secuencia de bases que sea complementaria a una secuencia diana en un ácido nucleico (normalmente un ARN) por emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia diana, con la condición de que la subunidad, el enlace entre subunidades o ambos no sean de origen natural. El oligómero antisentido es un PMO. En el presente documento se describen formas de realización de ejemplo adicionales.
- 55 Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a dos o más oligómeros (es decir, que cada uno comprende una secuencia de nucleobases) que están relacionados entre sí por las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia de nucleobases "T-G-A (5'→3')" es complementaria a la secuencia de nucleobases "A-C-T (3'→5')". La complementariedad puede ser "parcial", en la que menos de todas las nucleobases de una secuencia de nucleobases dada coinciden con la otra secuencia de nucleobases según las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, en algunas formas de realización, la complementariedad entre una secuencia de nucleobases dada y la otra secuencia de nucleobases puede ser de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 85%, aproximadamente el 90% o aproximadamente el 95%. O, puede haber una complementariedad "completa" o "perfecta" (100%) entre una secuencia de nucleobases dada y la otra secuencia de nucleobases para continuar con el ejemplo. El grado de complementariedad entre las secuencias de nucleobases tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre las secuencias.
- 60 65 Los términos "cantidad eficaz" y "cantidad terapéuticamente eficaz" se utilizan indistintamente en el presente

documento y se refieren a una cantidad de compuesto terapéutico, tal como un oligómero antisentido, administrado a un sujeto mamífero, ya sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis, que tiene eficacia para producir un efecto terapéutico deseado. Para un oligómero antisentido, este efecto se produce generalmente inhibiendo la traducción o el empalme-procesamiento natural de una secuencia diana seleccionada, o produciendo una cantidad clínicamente significativa de distrofina (significancia estadística).

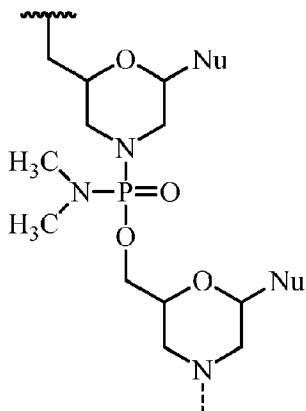
En algunas formas de realización, una cantidad eficaz es al menos 10 mg/kg, o al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido durante un periodo de tiempo para tratar al sujeto. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz es al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para aumentar el número de fibras positivas para distrofina en un sujeto a al menos el 20% de lo normal. En determinadas formas de realización, una cantidad eficaz es 10 mg/kg, o al menos 20 mg/kg de una composición que incluye un oligómero antisentido para estabilizar, mantener o mejorar la distancia de caminata a partir de un déficit del 20%, por ejemplo, en una 6 MWT, en un paciente, con respecto a un compañero sano. En varias formas de realización, una cantidad eficaz es de al menos 10 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de al menos 20 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 30 mg/kg, de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 30 mg/kg o de aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg. En algunas formas de realización, una cantidad eficaz es de aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg o aproximadamente 50 mg/kg. En otro aspecto, una cantidad eficaz es de al menos aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 30 mg/kg, o aproximadamente 30 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, durante al menos 24 semanas, al menos 36 semanas, o al menos 48 semanas, para aumentar así el número de fibras positivas para distrofina en un sujeto a al menos el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95% de lo normal, y estabilizar o mejorar la distancia de caminata a partir de un déficit del 20%, por ejemplo en una 6 MWT, en el paciente con respecto a un compañero sano. En algunas formas de realización, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina al 20-60%, o al 30-50% de lo normal en el paciente.

Los términos "mejora" o "que mejora", o "aumenta" o "que aumenta", o "estimula" o "que estimula", se refieren en general a la capacidad de uno o más conjugados de oligómero antisentido o composiciones farmacéuticas para producir o provocar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos cadena abajo) en una célula o un sujeto, en comparación con la respuesta provocada por un conjugado de oligómero no antisentido o un compuesto de control. Una mayor respuesta fisiológica puede incluir un aumento en la expresión de una forma funcional de una proteína distrofina, o un aumento en la actividad biológica relacionada con la distrofina en el tejido muscular, entre otras respuestas evidentes a partir de la comprensión de la técnica y la descripción del presente documento. También se puede medir el aumento de la función muscular, incluidos aumentos o mejoras en la función muscular en aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%. También se puede medir el porcentaje de fibras musculares que expresan una distrofina funcional, incluido el aumento de la expresión de distrofina en aproximadamente el 1%, 2%, 5%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de fibras musculares. Por ejemplo, se ha demostrado que puede producirse aproximadamente el 40% de mejora de la función muscular si el 25-30% de las fibras expresan distrofina (véase, por ejemplo, DelloRusso et al., Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). Una cantidad "aumentada" o "mejorada" es normalmente una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un aumento de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces (por ejemplo, 500, 1000 veces, incluidos todos los números enteros y puntos decimales intermedios y superiores a 1), por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por el oligómero antisentido conjugado (la ausencia de un agente) o un compuesto de control.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "función" y "funcional" y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

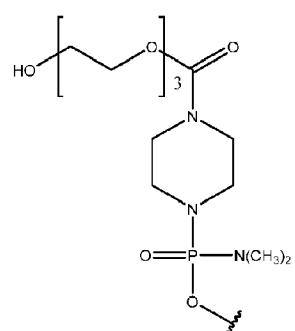
Una proteína distrofina "funcional" se refiere generalmente a una proteína distrofina que tiene suficiente actividad biológica para reducir la degradación progresiva del tejido muscular que de otro modo es característica de la distrofia muscular, normalmente en comparación con la forma alterada o "defectuosa" de la proteína distrofina que se encuentra presente en determinados sujetos con DMD o BMD. En determinadas formas de realización, una proteína distrofina funcional puede tener aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% (incluidos todos los números enteros intermedios) de la actividad biológica *in vitro* o *in vivo* de la distrofina de tipo silvestre, medida según técnicas habituales en la técnica. Como ejemplo, la actividad relacionada con la distrofina en cultivos musculares *in vitro* se puede medir según el tamaño de los miotubos, la organización (o desorganización) de las miofibrillas, la actividad contráctil y la agrupación espontánea de receptores de acetilcolina (véase, por ejemplo, Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999). Los modelos animales también son recursos valiosos para estudiar la patogénesis de la enfermedad y proporcionan un medio para evaluar la actividad relacionada con la distrofina. Dos de los modelos animales más utilizados para la investigación de la DMD son el ratón mdx y el perro golden retriever con distrofia muscular (GRMD), ambos negativos para distrofina (véase, por ejemplo, Collins y Morgan, Int J Exp Pathol 84: 165-172, 2003). Se pueden utilizar estos y otros modelos animales para medir la actividad funcional de varias proteínas distrofina. Se incluyen formas truncadas de distrofina, tales como las formas que se producen después de la administración de algunos de los conjugados de oligómero antisentido de omisión de exones de la presente divulgación.

- Los términos "desajuste" o "desajustes" se refieren a una o más nucleobases (ya sea contiguas o separadas) en una secuencia de nucleobases de oligómero que no son coincidentes con un pre-ARNm diana según las reglas de emparejamiento de bases. Si bien a menudo se desea una complementariedad perfecta, algunas formas de realización pueden incluir uno o más, pero preferentemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 desajustes con respecto al pre-ARNm diana. Se incluyen variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En determinadas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación incluyen variaciones en la secuencia de nucleobases cerca de las variaciones terminales en el interior, y si están presentes, normalmente se encuentran dentro de aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 subunidades de las extremos terminales 5' y/o 3'.
- 5 Los términos "morfolino", "oligómero de morfolino" y "PMO" se refieren a un oligómero de fosforodiamidato morfolino de la estructura general siguiente:



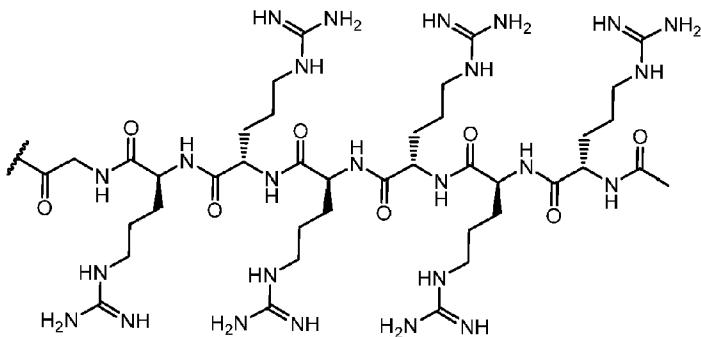
- 15 y tal como se describe en la figura 2 de Summerton, J., et al., Antisense & Nucleic Acid Drug Development, 7: 187-195 (1997). Los morfolinos, tal como se describen en el presente documento, incluyen todos los estereoisómeros y tautómeros de la estructura general anterior. La síntesis, las estructuras y las características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las patentes de Estados Unidos Nº: 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063, 5.506.337, 8.076.476 y 8.299.206.

- 20 El morfolino para su uso en la presente invención se conjuga en el extremo 5' del oligómero con un resto de "cola" para aumentar su estabilidad y/o solubilidad. El resto de cola tiene la estructura:

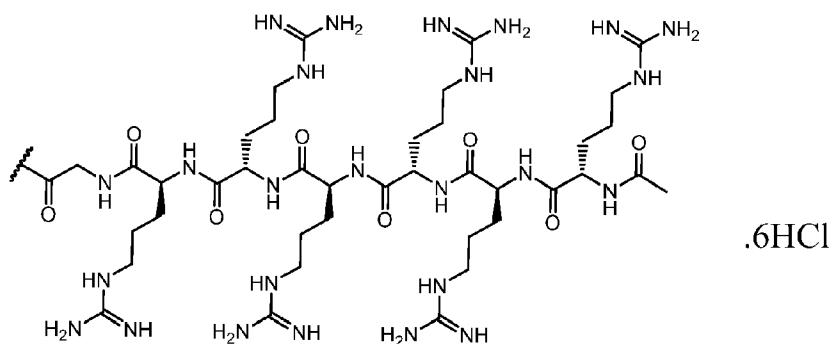


- 25 El resto de la cola anterior también se denomina en el presente documento "TEG" o "EG3".

- Tal como se utilizan en el presente documento, los términos "-G-R<sub>6</sub>" y "-G-R<sub>6</sub>-Ac" se usan indistintamente y se refieren a un resto peptídico conjugado con un oligómero antisentido de la divulgación. En diversas formas de realización, "G" 30 representa un resto de glicina conjugado con "R<sub>6</sub>" mediante un enlace amida, y cada "R" representa un residuo de arginina conjugado entre sí mediante enlaces amida de modo que "R<sub>6</sub>" significa seis (6) residuos de arginina conjugados entre sí mediante enlaces amida. Los residuos de arginina son residuos de L-arginina. "-G-R<sub>6</sub>" o "-G-R<sub>6</sub>-Ac" se conjuga con el nitrógeno del anillo de morfolina de la subunidad morfolino más 3' de un oligómero antisentido de PMO de la divulgación. "-G-R<sub>6</sub>" o "-G-R<sub>6</sub>-Ac" se conjuga con el extremo 3' de un oligómero antisentido de la divulgación y tiene la fórmula siguiente:



O



5

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

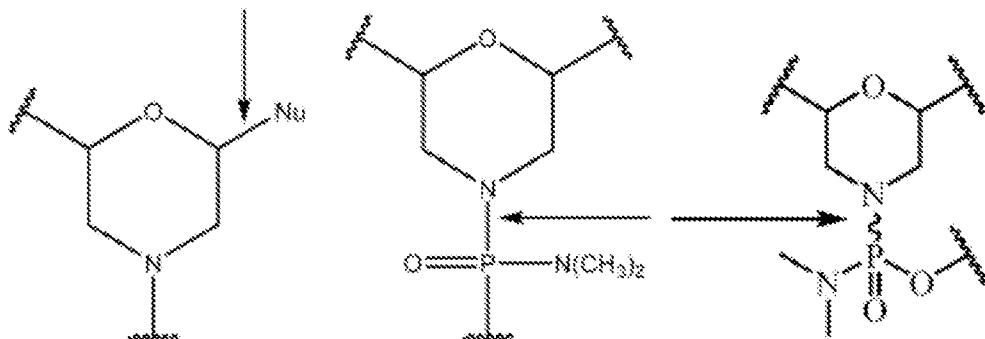
15 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", tal como se utilizan en el presente documento, significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

20 Para mayor claridad, las estructuras de la divulgación que incluyen, por ejemplo, la fórmula (IV), son continuas desde 5' hasta 3' y, para la conveniencia de representar la estructura completa en una forma compacta, se han incluido varias roturas en la ilustración con la etiqueta "ROTURA A", "ROTURA B" y "ROTURA C". Como entenderá el experto en la técnica, por ejemplo, cada indicación de "ROTURA A" muestra una continuación de la ilustración de la estructura en estos puntos. El experto en la técnica entenderá que lo mismo es cierto para cada caso de "ROTURA B" y para 25 "ROTURA C" en las estructuras anteriores. Ninguna de las roturas de la ilustración, sin embargo, pretende indicar, ni el experto en la técnica lo entendería así, una interrupción real de la estructura anterior.

30 Tal como se utiliza en el presente documento, un conjunto de paréntesis utilizados dentro de una fórmula estructural indica que la característica estructural entre los paréntesis se repite. En algunas formas de realización, los paréntesis utilizados pueden ser "[" y "]", y en determinadas formas de realización, los paréntesis utilizados para indicar características estructurales de repetición pueden ser "(" y ")". En algunas formas de realización, el número de iteraciones repetidas de la característica estructural entre los paréntesis es el número indicado fuera de los paréntesis, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, etc. En diversas formas de realización, el número de iteraciones repetidas de la característica estructural entre los paréntesis se indica mediante una variable indicada fuera de los paréntesis tal como "Z".

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

40



La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que la sustancia o la composición debe ser compatible, químicamente y/o toxicológicamente, con el resto de los ingredientes que componen una formulación y/o el sujeto que se trata con la misma.

- 5 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como se utiliza en el presente documento, significa una carga, un diluyente, un material de encapsulación o un auxiliar de formulación de cualquier tipo, sólido, semisólido o líquido, inerte y no tóxico. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente 10 aceptables son: azúcares tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles tales como propilenglicol; ésteres tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponadores tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua exenta 15 de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato; lubricantes compatibles no tóxicos tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio; agentes colorantes; agentes de desmoldeo; agentes de revestimiento; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes perfumantes; conservantes; y antioxidantes; según el criterio del formulador.
- 20 20 El término "restauración" con respecto a la síntesis o la producción de distrofina se refiere generalmente a la producción de una proteína distrofina que incluye formas truncadas de distrofina en un paciente con distrofia muscular después del tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, el tratamiento da como resultado un aumento en la producción de distrofina nueva en un paciente en un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% (incluidos todos los números enteros intermedios). En algunas formas de realización, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para 25 distrofina a al menos aproximadamente el 20%, aproximadamente el 30%, aproximadamente el 40%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 60%, aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90% o aproximadamente el 95% al 100% de lo normal en el sujeto. En otras formas de realización, el tratamiento aumenta el número de fibras positivas para distrofina a de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 60%, o de aproximadamente el 30% a aproximadamente el 50%, de lo normal en el sujeto. El porcentaje de fibras 30 positivas para distrofina en un paciente después del tratamiento puede determinarse mediante una biopsia muscular utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, se puede tomar una biopsia muscular de un músculo adecuado, tal como el músculo bíceps braquial de un paciente.
- 35 35 El análisis del porcentaje de fibras positivas para distrofina se puede realizar antes del tratamiento y/o después del tratamiento o en puntos temporales a lo largo del transcurso del tratamiento. En algunas formas de realización, se toma una biopsia posterior al tratamiento del músculo contralateral de la biopsia previa al tratamiento. El análisis de la expresión de distrofina antes y después del tratamiento se puede realizar utilizando cualquier ensayo adecuado para la distrofina. En algunas formas de realización, la detección inmunohistoquímica se realiza en secciones de tejido de la biopsia muscular utilizando un anticuerpo que es un marcador de distrofina, tal como un anticuerpo monoclonal o policlonal. Por ejemplo, se puede usar el anticuerpo MANDYS 106, que es un marcador muy sensible para la distrofina. Puede usarse cualquier anticuerpo secundario adecuado.
- 45 45 En algunas formas de realización, el porcentaje de fibras positivas para distrofina se calcula dividiendo el número de fibras positivas por el total de fibras contadas. Las muestras de músculo normales tienen un 100% de fibras positivas para distrofina. Por lo tanto, el porcentaje de fibras positivas para distrofina se puede expresar como un porcentaje de lo normal. Para controlar la presencia de niveles traza de distrofina en el músculo antes del tratamiento, así como fibras revertidas, se puede establecer un valor basal utilizando secciones de músculos antes del tratamiento de un paciente al contar las fibras positivas para distrofina en los músculos después del tratamiento. Este se puede usar como un valor umbral para el recuento de las fibras positivas para distrofina en las secciones del músculo después del tratamiento en ese paciente. En otras formas de realización, se pueden utilizar también secciones de tejido teñidas con anticuerpos para la cuantificación de distrofina usando el programa informático de análisis de imágenes Bioquant
- 50

(Bioquant Image Analysis Corporation, Nashville, TN). La intensidad total de la señal de fluorescencia de distrofina se puede notificar como un porcentaje de lo normal. Además, se puede utilizar el análisis de inmunotransferencia Western con anticuerpos monoclonales o policlonales anti-distrofina para determinar el porcentaje de fibras positivas para distrofina. Por ejemplo, puede usarse el anticuerpo anti-distrofina NCL-Dys1 de Leica Biosystems. El porcentaje de fibras positivas para distrofina también se puede analizar determinando la expresión de los componentes del complejo sarcoglicano ( $\beta$ ,  $\gamma$ ) y/o NOS neuronal.

En algunas formas de realización, el tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación ralentiza o reduce la disfunción progresiva y/o el fallo de los músculos respiratorios en pacientes con DMD que se esperaría sin tratamiento. En algunas formas de realización, el tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación puede reducir o suprimir la necesidad de asistencia de ventilación que se esperaría sin tratamiento. En algunas formas de realización, las mediciones de la función respiratoria para realizar un seguimiento del curso de la enfermedad, así como la evaluación de posibles intervenciones terapéuticas, incluyen la presión inspiratoria máxima (MIP), la presión espiratoria máxima (MEP) y la capacidad vital forzada (FVC). La MIP y la MEP miden el nivel de presión que una persona puede generar durante la inhalación y la exhalación, respectivamente, y son medidas sensibles de la fuerza de los músculos respiratorios. La MIP es una medida de la debilidad del músculo del diafragma.

En algunas formas de realización, la MEP puede disminuir antes de cambios en otros ensayos de función pulmonar, incluidas la MIP y la FVC. En determinadas formas de realización, la MEP puede ser un indicador precoz de una disfunción respiratoria. En determinadas formas de realización, la FVC se puede usar para medir el volumen total de aire expulsado durante la exhalación forzada después de una inspiración máxima. En pacientes con DMD, la FVC aumenta concomitantemente con el crecimiento físico hasta los primeros años de la adolescencia. Sin embargo, a medida que el crecimiento se ralentiza o se paraliza por la progresión de la enfermedad y la debilidad muscular avanza, la capacidad vital entra en una fase descendente y disminuye a una tasa promedio de aproximadamente el 8 al 8,5 por ciento por año después de los 10 a 12 años de edad. En determinadas formas de realización, el porcentaje de MIP previsto (MIP ajustada por peso), el porcentaje de MEP previsto (MEP ajustada por edad) y el porcentaje de FVC previsto (FVC ajustada por edad y altura) son análisis de apoyo.

Los términos "sujeto" y "paciente", tal como se utilizan en el presente documento, incluyen cualquier animal que presente un síntoma, o se encuentre en riesgo de presentar un síntoma, que pueda tratarse con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación, tal como un sujeto (o paciente) que padece o se encuentra en riesgo de padecer DMD o BMD, o cualquiera de los síntomas asociados con estas afecciones (por ejemplo, pérdida de fibra muscular). Los sujetos (o pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como ratones, ratas, conejos o cobayas), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tales como gatos o perros). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes (o sujetos) humanos. También se incluyen procedimientos para producir distrofina en un sujeto (o paciente) que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado por vía periférica", tal como se utilizan en el presente documento, significan la administración de un compuesto, fármaco u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de modo que ingrese al sistema del paciente y, por lo tanto, esté sujeto al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, la administración subcutánea.

La fase "secuencia de direccionamiento" se refiere a una secuencia de nucleobases de un oligómero que es complementaria a una secuencia de nucleótidos en un pre-ARNm diana. La secuencia de nucleótidos en el pre-ARNm diana es un sitio de hibridación del exón 45 en el pre-ARNm de la distrofina designado como H45A (-03+19).

"Tratamiento" de un sujeto (por ejemplo un mamífero, tal como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención utilizada en un intento de alterar el curso natural del sujeto o la célula. El tratamiento incluye, pero sin limitación, la administración de un oligómero o una composición farmacéutica del mismo, y puede realizarse profilácticamente o después del inicio de un evento patológico o del contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección asociada con la proteína distrofina, tal como en determinadas formas de distrofia muscular, y puede incluir, por ejemplo, mejoras o cambios mínimos en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se está tratando. También se incluyen tratamientos "profilácticos", que pueden estar dirigidos a reducir la velocidad de progresión de la enfermedad o afección que se está tratando, retrasar la aparición de esa enfermedad o afección, o reducir la gravedad de su aparición. "Tratamiento" o "profilaxis" no necesariamente indica la erradicación, la cura o la prevención completa de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados de la misma.

En algunas formas de realización, el tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación aumenta la producción de distrofina nueva, retraza la progresión de la enfermedad, ralentiza o reduce la pérdida de la deambulación, reduce la inflamación muscular, reduce el daño muscular, mejora la función muscular, reduce la pérdida de la función pulmonar y/o mejora la regeneración muscular que se esperaría sin tratamiento. En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene, retrasa o ralentiza la progresión de la enfermedad. En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene la deambulación o reduce la pérdida de deambulación. En algunas formas de

realización, el tratamiento mantiene la función pulmonar o reduce la pérdida de función pulmonar. En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de caminata estable en un paciente, medida, por ejemplo, mediante la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT). En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para caminar/correr 10 metros (es decir, la prueba de caminar/correr 10 metros). En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para ponerse de pie desde la posición supina (es decir, prueba del tiempo para ponerse de pie). En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene o reduce el tiempo para subir cuatro escalones estándar (es decir, la prueba de subida de cuatro escalones). En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene o reduce la inflamación muscular en el paciente, medida mediante, por ejemplo, resonancia magnética (por ejemplo, resonancia magnética de los músculos de la pierna). En algunas formas de realización, la MRI mide T2 y/o la fracción de grasa para identificar la degeneración muscular. La MRI puede identificar cambios en la estructura y la composición muscular provocados por inflamación, edema, daño muscular e infiltración de grasa.

En algunas formas de realización, el tratamiento con un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación aumenta la producción de distrofina nueva y ralentiza o reduce la pérdida de deambulación que se esperaría sin tratamiento. Por ejemplo, el tratamiento puede estabilizar, mantener, mejorar o aumentar la capacidad para caminar (por ejemplo, estabilización de la deambulación) en el sujeto. En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene o aumenta una distancia de caminata estable en un paciente, medida, por ejemplo, mediante la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT), descrita por McDonald, et al. (*Muscle Nerve*, 2010; 42:966-74, que se incorpora en la presente como referencia). Un cambio en la distancia de caminata de 6 minutos (6MWD) se puede expresar como un valor absoluto, un cambio porcentual o un cambio en el % del valor previsto. En algunas formas de realización, el tratamiento mantiene o mejora una distancia de caminata estable en una 6MWT a partir de un déficit del 20% en el sujeto con respecto a un compañero sano. El rendimiento de un paciente con DMD en la 6MWT con respecto al rendimiento típico de un compañero sano se puede determinar calculando un % del valor previsto. Por ejemplo, el % de 6MWD previsto se puede calcular utilizando la siguiente ecuación para varones:  $196,72 + (39,81 \times \text{edad}) - (1,36 \times \text{edad}^2) + (132,28 \times \text{altura en metros})$ . Para las mujeres, el % previsto de 6MWD puede calcularse mediante la siguiente ecuación:  $188,61 + (51,50 \times \text{edad}) - (1,86 \times \text{edad}^2) + (86,10 \times \text{altura en metros})$  (Henricson et al. *PLoS Curr.*, 2012, versión 2). En algunas formas de realización, el tratamiento con un oligómero antisentido aumenta la distancia de caminata estable en el paciente desde el valor basal a más de 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30 o 50 metros (incluidos todos los números enteros intermedios).

La pérdida de la función muscular en pacientes con DMD puede tener lugar contra los antecedentes de crecimiento y desarrollo infantil normal. De hecho, los niños más pequeños con DMD pueden mostrar un aumento en la distancia recorrida durante la 6MWT a lo largo del transcurso de aproximadamente 1 año a pesar del deterioro muscular progresivo. En algunas formas de realización, la 6MWD de pacientes con DMD se compara con sujetos de control de desarrollo normal y con datos normativos existentes de sujetos emparejados por edad y sexo. En algunas formas de realización, el crecimiento y el desarrollo normales pueden tenerse en cuenta utilizando una ecuación basada en la edad y la altura ajustada a los datos normativos. Dicha ecuación se puede usar para convertir 6MWD a un valor porcentual previsto (% previsto) en sujetos con DMD. En determinadas formas de realización, el análisis de los datos de % de 6MWD previstos representa un procedimiento para considerar el crecimiento y el desarrollo normales, y puede mostrar que las ganancias en la función a edades tempranas (por ejemplo, inferiores o iguales a 7 años) representan capacidades estables más que mejoras en pacientes con DMD (Henricson et al. *PLoS Curr.*, 2012, versión 2).

Se propuso y se publicó un sistema de nomenclatura de moléculas antisentido para distinguir entre las diferentes moléculas antisentido (véase Mann et al., (2002) *J Gen Med* 4, 644-654). Esta nomenclatura se volvió especialmente relevante cuando se analizaron varias moléculas antisentido ligeramente diferentes, todas dirigidas a la misma región diana, tal como se muestra a continuación:

H#A/D(x:y)

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

## II. Oligómeros antisentido

### A. Conjugados de oligómero antisentido diseñados para inducir la omisión del exón 45

Los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la divulgación son de fórmula (IV) o (IVA) como se definen anteriormente, y son complementarios a una región diana del exón 45 del gen de la distrofina e inducen la omisión del

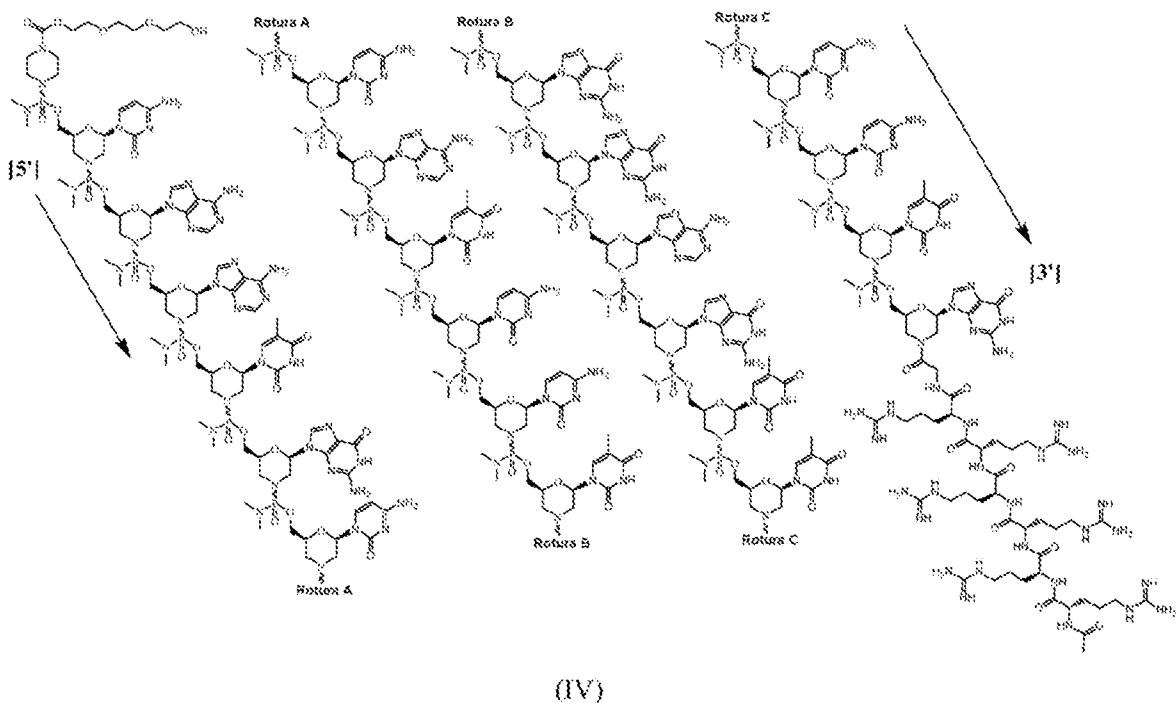
exón 45. En particular, la divulgación se refiere a conjugados de oligómero antisentido complementarios a una región diana del exón 45 del pre-ARNm de distrofina designada como sitio de hibridación. El sitio de hibridación es H45A(-03+19).

- 5 Los conjugados de oligómero antisentido del pre-ARNm de distrofina diana de la divulgación inducen la omisión del  
10 exón 45, por lo que se excluye o se omite del transcripto de ARNm maduro y empalmado. Mediante la omisión del exón  
10 45, el marco de lectura alterado se restaura a una mutación en marco. Si bien la DMD se compone de varios subtipos  
10 genéticos, los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación se diseñaron específicamente para omitir el exón  
10 45 del pre-ARNm de distrofina. Las mutaciones de DMD susceptibles a la omisión del exón 45 comprenden un  
10 subgrupo de pacientes con DMD (13%).

#### B. Características químicas de los oligómeros

##### Oligómeros de morfolino

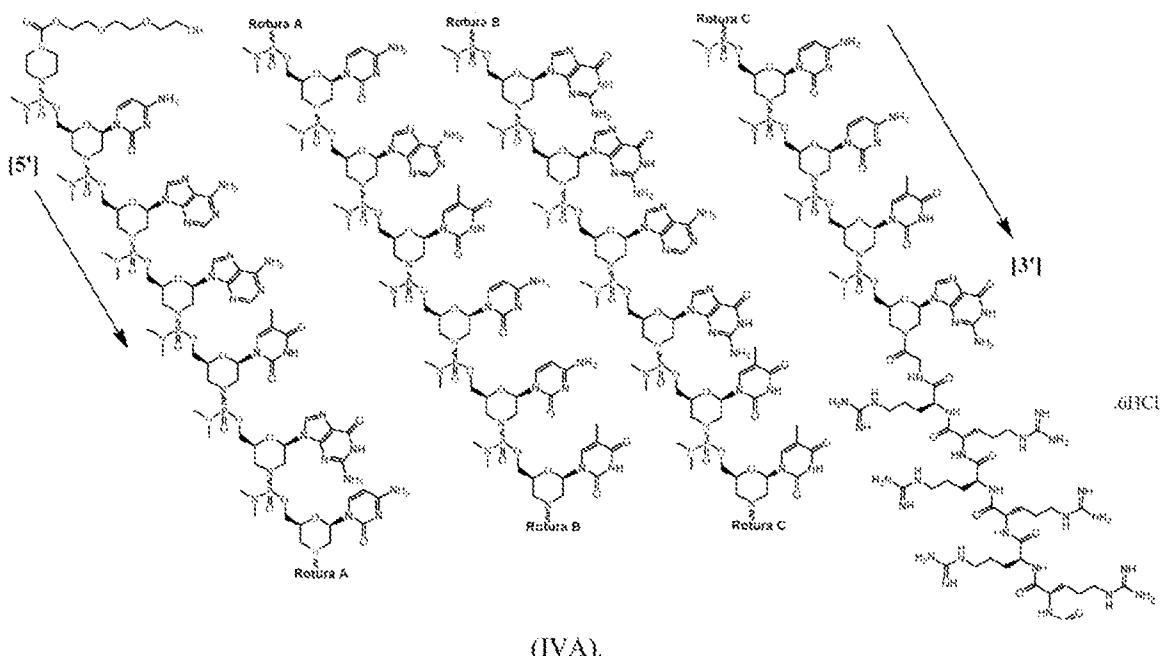
15 El conjugado de oligómero antisentido para su uso en la presente invención es según la fórmula (IV):



- 20 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas formas de realización, un conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) es una sal de HCl (ácido clorhídrico) del mismo. En determinadas formas de realización, la sal de HCl es una sal de .6HCl.

- 25 En algunas formas de realización, que incluyen, por ejemplo, formas de realización de conjugados de oligómero antisentido de fórmula (IV), un conjugado de oligómero antisentido para su uso en la invención es según la fórmula (IVA):



#### Sales farmacéuticamente aceptables de conjugados de oligómero antisentido

5 Determinadas formas de realización de conjugados de oligómero antisentido descritos en el presente documento pueden contener un grupo funcional básico, tal como amino o alquilamino, y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables", a este respecto, se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos, relativamente no tóxicas, de conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación. Estas sales se pueden preparar *in situ* en el vehículo de administración o en el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o haciendo reaccionar por separado un conjugado de oligómero antisentido purificado de la descripción en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado, y aislando la sal así formada durante una purificación posterior. Las sales representativas incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato. (Véase, por ejemplo, Bergé et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

20 Las sales farmacéuticamente aceptables de los conjugados de oligómero antisentido en cuestión incluyen las sales no tóxicas convencionales o las sales de amonio cuaternario de los conjugados de oligómero antisentido, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, dichas sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico, y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico e isotiónico.

30 En determinadas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. El término "sales farmacéuticamente aceptables" en estos casos se refiere a las sales de adición de bases orgánicas e inorgánicas relativamente no tóxicas de conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación. Estas sales también se pueden preparar *in situ* en el vehículo de administración o en el proceso de fabricación de la forma de dosificación, o haciendo reaccionar por separado el conjugado de oligómero antisentido purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, tal como el hidróxido, el carbonato o el bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoniaco, o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable, y similares. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio. Las aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina y piperazina. (Véase, por ejemplo, Berge et al., anteriormente).

#### 40 III Formulaciones y modos de administración

En determinadas formas de realización, la presente divulgación proporciona formulaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración terapéutica de conjugados de oligómero antisentido, tal como se

describe en el presente documento. Por lo tanto, en determinadas formas de realización, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables para su uso en la invención que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los conjugados de oligómero antisentido descritos en el presente documento, formulados junto con uno o más vehículos (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Si bien es posible

5 que un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación se administre solo, se prefiere administrar el conjugado de oligómero antisentido en forma de una formulación farmacéutica (composición). El conjugado de oligómero antisentido de la formulación es según la fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 Los procedimientos para el suministro de moléculas de ácido nucleico que pueden aplicarse a los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la presente divulgación se describen, por ejemplo, en: Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, CRC Press; y Sullivan et al., documento PCT WO 94/02595. Pueden utilizarse estos y otros protocolos para la administración de prácticamente cualquier molécula de ácido nucleico, incluidos los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación.

15 Las composiciones farmacéuticas para su uso en la presente divulgación pueden formularse especialmente para su administración en forma sólida o líquida, incluidas las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, pociónes (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos (previstos para absorción bucal, sublingual o sistémica), bolos, polvos, gránulos, pastas para su aplicación en la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una solución o suspensión estéril, o una formulación de liberación mantenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como crema, ungüento, o una pulverización o un parche de liberación controlada aplicados a la piel; (4) por vía intravaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, una crema o una espuma; (5) por vía sublingual; (6) por vía ocular; (7) por vía transdérmica; o (8) por vía nasal.

20 25 30 35 Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: (1) azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) tragacanto en polvo; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, tales como propileneglicol; (11) polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes tamponadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua exenta de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones con tampón de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

40 Los ejemplos no limitantes adicionales de agentes adecuados para la formulación con los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la presente divulgación incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG; ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos; ácidos nucleicos que contienen restos lipofílicos; fosforotioatos; inhibidores de la glicoproteína P (tales como Pluronic P85) que pueden mejorar la entrada de fármacos en diversos tejidos; polímeros biodegradables, tales como microesferas de polí(D,L-lactida-coglicolida) para la administración de liberación mantenida después del implante (Emerich, DF et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas, tales como las fabricadas de polibutilcianoacrilato, que pueden administrar fármacos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

50 55 60 La divulgación también presenta el uso de la composición que comprende liposomas modificados en superficie que contienen lípidos de poli(etenglicol) ("PEG") (modificados con PEG, ramificados y no ramificados o combinaciones de los mismos, o liposomas de circulación prolongada o liposomas sigilosos). Estas formulaciones ofrecen un procedimiento para aumentar la acumulación de fármacos en los tejidos diana. Esta clase de vehículos de fármacos resiste la opsonización y la eliminación por el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), lo que permite tiempos de circulación sanguínea más prolongados y una mayor exposición de los tejidos para el fármaco encapsulado (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Se ha demostrado que dichos liposomas se acumulan selectivamente en tumores, presumiblemente por extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Los liposomas de circulación prolongada mejoran la farmacocinética y la farmacodinámica del ADN y el ARN, particularmente en comparación con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en los tejidos de la MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., publicación PCT internacional N° WO 96/10391; Ansell et al., publicación PCT internacional N° WO 96/10390; Holland et al., publicación PCT internacional N° WO 96/10392). También es probable que los liposomas de circulación prolongada protejan a los fármacos de la degradación por nucleasas en mayor medida en comparación con los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en tejidos de MPS metabólicamente agresivos, tales como el hígado y el bazo.

65 En una forma de realización adicional, la presente divulgación incluye composiciones farmacéuticas de conjugados de

oligómero antisentido para su uso reivindicado preparadas para administración tal como se describe en las patentes de Estados Unidos Nº: 6.692.911, 7.163.695 y 7.070.807. En este sentido, en una forma de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación en una composición para su uso reivindicado que comprende copolímeros de lisina e histidina (HK) (tal como se describe en las patentes de

5 Estados Unidos Nº: 7.163.695, 7.070.807 y 6.692.911) ya sea solos o en combinación con PEG (por ejemplo, PEG ramificado o no ramificado o una mezcla de ambos), en combinación con PEG y un resto de direccionamiento, o cualquiera de los anteriores en combinación con un agente de reticulación. En determinadas formas de realización, la 10 presente divulgación proporciona conjugados de oligómero antisentido en composiciones farmacéuticas para su uso reivindicado que comprenden polihistidina modificada con ácido glucónico o polihistidina gluconilada/transferrina-polilisina. Un experto en la técnica también reconocerá que se pueden sustituir aminoácidos con propiedades similares 15 a His y Lys dentro de la composición.

También pueden estar presentes en las composiciones agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes (tales como 15 laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio), agentes colorantes, agentes de desmoldeo, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes perfumantes, conservantes y antioxidantes.

Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como 20 ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio y sulfito de sodio; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), 25 lecitina, galato de propilo y alfa-tocoferol; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y ácido fosfórico.

Las formulaciones de la presente divulgación incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar 25 convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica farmacéutica. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del sujeto que se esté tratando y del modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una 30 forma de dosificación única generalmente será la cantidad de principio activo que produce un efecto terapéutico. En general, esta cantidad variará entre aproximadamente el 0,1 por ciento y aproximadamente el noventa y nueve por ciento del principio activo, preferentemente entre aproximadamente el 5 por ciento y aproximadamente el 70 por ciento, de forma más preferida entre aproximadamente el 10 por ciento y aproximadamente el 30 por ciento.

35 En determinadas formas de realización, una formulación para su uso en la presente divulgación comprende un excipiente seleccionado de entre ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes formadores de micelas, por ejemplo ácidos biliares y vehículos poliméricos, por ejemplo poliésteres y polianhídridos; y un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación. El conjugado de oligómero antisentido de la formulación para su uso en la invención es según la fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable. En determinadas formas de realización, una formulación mencionada anteriormente hace biodisponible por vía oral un conjugado de oligómero antisentido de 40 la presente divulgación.

45 Los procedimientos para preparar estas formulaciones o composiciones farmacéuticas incluyen la etapa de asociar un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes accesorios. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

50 Las formulaciones para su uso en la divulgación adecuadas para la administración oral pueden encontrarse en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (utilizando una base aromatizada, generalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos o como una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como enjuagues bucales, y similares, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada de un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación como principio activo. Un conjugado de oligómero antisentido para su uso en la presente 55 divulgación también se puede administrar como bolo, electuario o pasta.

60 En las formas de dosificación sólidas de la divulgación para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y pastillas), el principio activo puede mezclarse con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardantes de la solución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y tensioactivos, tales como poloxámero 65 y laurilsulfato de sodio; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol y tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco,

- 5 estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, estearato de zinc, estearato de sodio, ácido esteárico y mezclas de los mismos; (10) agentes colorantes; y (11) agentes de liberación controlada tales como crospovidona o etilcelulosa. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponadores. También pueden emplearse composiciones farmacéuticas sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina blanda y de cubierta dura utilizando excipientes tales como lactosa o azúcares lácteos, así como polietilenglicoles de alto peso molecular.
- 10 Un comprimido se puede fabricar por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Los comprimidos prensados se pueden preparar utilizando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmelcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgragante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetilcelulosa sódica reticulada), agente tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 Los comprimidos y otras formas de dosificación sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden opcionalmente ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica. También se pueden formular para proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmelcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden formularse para una liberación rápida, por ejemplo, liofilizados. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene las bacterias, o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones farmacéuticas sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril, inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libere el o los principios activos solo, o preferentemente, en una determinada porción del sistema gastrointestinal, opcionalmente, de forma retardada. Los ejemplos de composiciones de embebido que se pueden utilizar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si procede, con uno o varios de los excipientes descritos anteriormente.
- 30 Las formas de dosificación líquidas para la administración oral de los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencílico, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos.
- 40 Además de los diluyentes inertes, las composiciones farmacéuticas de uso oral también pueden incluir coadyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.
- 45 Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilen-sorbitol y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.
- 50 Las formulaciones para la administración rectal o vaginal se pueden presentar en forma de suppositorio, que se puede preparar mezclando uno o más compuestos de la divulgación con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente, pero líquido a temperatura corporal y, por lo tanto, se derretirá en el recto o en la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.
- 55 Las formulaciones o formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de un oligómero tal como se proporciona en el presente documento incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. Los conjugados de oligómero activos se pueden mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable y con cualquier conservante, tampón o propelador que pueda ser necesario. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de la presente divulgación, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos.
- 60 65 Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y poliamida en polvo, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener además propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar una administración controlada de un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación al cuerpo. Dichas formas de dosificación pueden prepararse disolviendo o dispersando el oligómero en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del agente a través de la piel. La velocidad de dicho flujo se puede controlar proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el agente en una matriz polimérica o gel, entre otros procedimientos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más conjugados de oligómero de la divulgación en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes de su uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidex adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. El conjugado de oligómero antisentido de la composición farmacéutica para su uso reivindicado es según la fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Estas composiciones farmacéuticas también pueden contener coadyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos sobre los conjugados de oligómero en cuestión se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol y ácido fenolsórbico. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares y cloruro de sodio en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede lograrse mediante la inclusión de agentes que retrasen la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

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

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

Cuando los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación se administran como productos farmacéuticos a seres humanos y animales, se pueden administrar *per se* o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, del 0,1 al 99% (de forma más preferida, del 10 al 30%) del conjugado de oligómero antisentido en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones o preparaciones de la presente divulgación pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o rectal. Por lo general, se administran en formas adecuadas para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en forma de comprimidos o cápsulas, por inyección, inhalación, loción ocular, ungüento, suppositorio o infusión; por vía tópica mediante loción o ungüento; o por vía rectal mediante supositorios.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación, que pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación, pueden formularse en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración en particular, sin que sea inaceptablemente tóxica para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores que incluyen la actividad del conjugado de oligómero antisentido particular de la presente divulgación empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción o el metabolismo del oligómero particular que se está empleando, la velocidad y el grado de absorción, la duración del tratamiento, otros medicamentos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con el oligómero particular empleado, la edad, el sexo, el peso, la condición,

la salud general y los antecedentes médicos previos del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

- 5 Un médico o veterinario experto en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar las dosis de los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación empleados en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un conjugado de oligómero antisentido de la divulgación será la cantidad del conjugado de oligómero antisentido que sea la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis eficaz dependerá generalmente de los factores descritos en el presente documento. Generalmente, las dosis orales, intravenosas, intracerebroventriculares y subcutáneas de los conjugados de oligómero antisentido de la presente divulgación para un paciente, cuando se usan para los efectos indicados, variarán entre aproximadamente 0,0001 y aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día.
- 10 15 En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la presente divulgación se administran en dosis generalmente de aproximadamente 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunos casos, pueden ser necesarias dosis superiores a 160 mg/kg. En algunas formas de realización, las dosis para administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a 160 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran a dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran a dosis de aproximadamente 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg /kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg /kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg /kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, incluidos todos los números enteros intermedios. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 10 mg/kg. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 20 mg/kg. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 30 mg/kg. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 40 mg/kg. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 60 mg/kg. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 80 mg/kg. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 160 mg/kg. En algunas formas de realización, el oligómero se administra a 50 mg/kg.
- 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160
- En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra en dosis generalmente de aproximadamente 10-160 mg/kg o 20-160 mg/kg. En algunas formas de realización, las dosis del conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para administración i.v. son de aproximadamente 0,5 mg a 160 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg o 10 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a dosis de aproximadamente 10 mg/kg, 11 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 18 mg/kg, 20 mg/kg, 21 mg/kg, 25 mg/kg, 26 mg/kg, 27 mg/kg, 28 mg/kg, 29 mg/kg, 30 mg/kg, 31 mg/kg, 32 mg/kg, 33 mg/kg, 34 mg/kg, 35 mg/kg, 36 mg/kg, 37 mg/kg, 38 mg/kg, 39 mg/kg, 40 mg/kg, 41 mg/kg, 42 mg/kg, 43 mg/kg, 44 mg/kg, 45 mg/kg, 46 mg/kg, 47 mg/kg, 48 mg/kg, 49 mg/kg 50 mg/kg, 51 mg/kg, 52 mg/kg, 53 mg/kg, 54 mg/kg, 55 mg/kg, 56 mg/kg, 57 mg/kg, 58 mg/kg, 59 mg/kg, 60 mg/kg, 65 mg/kg, 70 mg/kg, 75 mg/kg, 80 mg/kg, 85 mg/kg, 90 mg/kg, 95 mg/kg, 100 mg/kg, 105 mg/kg, 110 mg/kg, 115 mg/kg, 120 mg/kg, 125 mg/kg, 130 mg/kg, 135 mg/kg, 140 mg/kg, 145 mg/kg, 150 mg/kg, 155 mg/kg, 160 mg/kg, incluidos todos los números enteros intermedios. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 10 mg/kg.
- En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 20 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 30 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (III) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 40 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 60 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 80 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 160 mg/kg. En algunas formas de realización, el conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administra a 50 mg/kg.
- Si se desea, la dosis diaria eficaz del compuesto activo se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. En determinadas situaciones, la dosificación es una administración al día. En determinadas formas de realización, la dosificación es una o más administraciones cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días,

o cada 1, 2, 3, 4, 5 , 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 semanas, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, según sea necesario, para mantener la expresión deseada de una proteína distrofina funcional. En determinadas formas de realización, la dosificación es una o más administraciones una vez cada dos semanas. En algunas formas de realización, la dosificación es una administración una vez cada dos semanas. En varias formas de realización, la dosificación es una o más administraciones al mes. En determinadas formas de realización, la dosificación es una administración al mes.

En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la invención se administran semanalmente a 10 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 20 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 30 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 40 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 60 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 80 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 100 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran semanalmente a 160 mg/kg. Tal como se utiliza en el presente documento, se entiende que semanalmente tiene el significado aceptado en la técnica de cada semana.

En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la invención se administran cada dos semanas a 10 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada dos semanas a 20 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada dos semanas a 30 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada dos semanas a 40 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada dos semanas a 60 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada dos semanas a 80 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada dos semanas a 100 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada dos semanas a 160 mg/kg. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que cada dos semanas tiene el significado aceptado en la técnica de una vez cada dos semanas.

En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la invención se administran cada tres semanas a 10 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 20 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 30 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 40 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 60 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 80 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 100 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran cada tres semanas a 160 mg/kg. Tal como se usa en el presente documento, se entiende que cada tres semanas tiene el significado aceptado en la técnica de una vez cada tres semanas.

En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido para su uso en la invención se administran mensualmente a 10 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 20 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 30 mg/kg. En varias formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 40 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 60 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 80 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 100 mg/kg. En algunas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran mensualmente a 160 mg/kg. Tal como se usa en el presente documento, mensualmente se entiende que tiene el significado aceptado en la técnica de cada mes.

Como se entenderá en la técnica, las administraciones semanales, quincenales, cada tres semanas o mensuales pueden ser en una o más administraciones o subdosis tal como se describen en el presente documento.

Las moléculas de ácido nucleico y los conjugados de oligómero antisentido descritos en el presente documento se pueden administrar a las células mediante una diversidad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, encapsulación en liposomas, mediante iontoforesis o mediante incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas, tal como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. En determinadas formas de realización, se puede utilizar la tecnología de microemulsificación para mejorar la biodisponibilidad de los agentes farmacéuticos lipófilos (insolubles en agua). Los ejemplos incluyen trimetrina (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991) y REV 5901 (Sheen, PC, et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Entre otros beneficios, la microemulsificación proporciona una mayor biodisponibilidad al dirigir preferentemente la absorción al sistema linfático en lugar de al sistema circulatorio, por lo que se evita el hígado y se previene la destrucción de los

compuestos en la circulación hepatobiliar.

En un aspecto de la divulgación, las formulaciones contienen micelas formadas a partir de un oligómero tal como se proporciona en el presente documento y al menos un vehículo anfifílico, en el que las micelas tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 100 nm. Formas de realización más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 50 nm, y formas de realización incluso más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 30 nm, o incluso inferior a aproximadamente 20 nm.

Si bien se contemplan todos los vehículos anfifílicos adecuados, los vehículos preferidos en el presente documento son generalmente aquellos que tienen el estado Generalmente Reconocido como Seguro (GRAS), y que pueden tanto solubilizar un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación como microemulsionarlo en una etapa posterior cuando la solución entra en contacto con una fase acuosa compleja (tal como la que se encuentra en el sistema gastrointestinal humano). Por lo general, los ingredientes anfifílicos que satisfacen estos requisitos tienen valores de HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo) de 2 a 20, y sus estructuras contienen radicales alifáticos de cadena lineal en el intervalo de C-6 a C-20. Los ejemplos son glicéridos grasos polietilenglicolizados y polietilenglicos.

Los ejemplos de vehículos anfifílicos incluyen glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolizados saturados y monoinsaturados, tales como los obtenidos a partir de diversos aceites vegetales totalmente o parcialmente hidrogenados. Dichos aceites pueden consistir ventajosamente en tri-, di- y mono-glicéridos de ácidos grasos y di- y mono-ésteres de poli(etilenglicol) de los ácidos grasos correspondientes, con una composición de ácidos grasos particularmente preferida que incluye ácido cáprico al 4-10%, ácido cáprico al 3-9%, ácido láurico al 40-50%, ácido mirístico al 14-24%, ácido palmítico al 4-14% y ácido esteárico al 5-15%. Otra clase útil de vehículos anfifílicos incluye sorbitán y/o sorbitol parcialmente esterificados, con ácidos grasos saturados o monoinsaturados (serie SPAN) o análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).

Los vehículos anfifílicos disponibles comercialmente pueden ser particularmente útiles, incluidos los de la serie Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglisol (todos fabricados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), monooleato de PEG, dioleato de PEG, monolaurato y dilaurato de PEG, lecitina, polisorbato 80, etc. (producidoss y distribuidos por varias empresas de Estados Unidos y de todo el mundo).

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

Los polímeros hidrófilos adecuados para su uso en la presente divulgación son aquellos que son fácilmente solubles en agua, se pueden unir covalentemente a un lípido formador de vesículas y se toleran *in vivo* sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen poli(etilenglicol) (PEG), poliláctico (también denominado polilactida), ácido poliglicólico (también denominado poliglicolida), un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico y poli(alcohol vinílico). En determinadas formas de realización, los polímeros tienen un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 100 o 120 daltons hasta aproximadamente 5000 o 10 000 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 5000 daltons. En otras formas de realización, el polímero es poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 100 a aproximadamente 5000 daltons, o que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 300 a aproximadamente 5000 daltons. En determinadas formas de realización, el polímero es un poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular promedio en peso de aproximadamente 750 daltons, por ejemplo, PEG(750). Los polímeros también se pueden definir por el número de monómeros que contienen; una forma de realización preferida de la presente divulgación utiliza polímeros de al menos aproximadamente tres monómeros, en la que dichos polímeros de PEG que consisten en tres monómeros tienen un peso molecular de aproximadamente 132 daltons.

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

En determinadas formas de realización, una formulación para su uso en la presente divulgación comprende un polímero biocompatible seleccionado del grupo que consiste en poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, polímeros de polivinilo, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas, polipropileno, polietilenos, poliestireno, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, polí(ortho)ésteres, poli(ácido bético), poli(ácido valérico), poli(lactida-co-caprolactona), polisacáridos, proteínas, ácidos polihialurónicos, policianoacrilatos y combinaciones, mezclas o copolímeros de los mismos.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que consisten en 6, 7 u 8 unidades de glucosa, designadas por la letra griega  $\alpha$ ,  $\beta$  o  $\gamma$ , respectivamente. Las unidades de glucosa están unidas por enlaces  $\alpha$ -1,4-glucosídicos. Como

consecuencia de la conformación de silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) están ubicados en un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 están ubicados en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrófilas, lo que hace que las ciclodextrinas sean solubles en agua. Por el contrario, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrófobas, ya que están revestidas por el hidrógeno de los átomos C-3 y C-5 y por oxígenos de tipo éter. Estas matrices permiten la formación de complejos con una diversidad de compuestos relativamente hidrófobos, incluidos, por ejemplo, compuestos esteroideos tales como el 17α-estradiol (véase, por ejemplo, van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). La complejación tiene lugar por interacciones de Van der Waals y por formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de las ciclodextrinas, véase Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994).

Las propiedades fisicoquímicas de los derivados de ciclodextrina dependen en gran medida del tipo y el grado de sustitución. Por ejemplo, su solubilidad en agua varía de insoluble (por ejemplo, triacetil-beta-ciclodextrina) al 147% soluble (p/v) (G-2-beta-ciclodextrina). Además, son solubles en muchos disolventes orgánicos. Las propiedades de las ciclodextrinas permiten controlar la solubilidad de varios componentes de la formulación aumentando o disminuyendo su solubilidad.

Se han descrito numerosas ciclodextrinas y procedimientos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), et al. (patente de Estados Unidos Nº 3.453.259) y Gramera, et al. (patente de Estados Unidos Nº 3.459.731) han descrito ciclodextrinas electroneutrales. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), patente de Estados Unidos Nº 3.453.257], ciclodextrinas reticuladas insolubles (Solms, patente de Estados Unidos Nº 3.420.788), y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), patente de Estados Unidos Nº 3.426.011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, se han adjuntado ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfónicos, ácidos tiosulfánicos y ácidos sulfónicos a la ciclodextrina original [véase, Parmeter (III), anteriormente]. Además, se han descrito derivados de sulfoalquil éter ciclodextrina por Stella, et al. (patente de Estados Unidos Nº 5.134.127).

Los liposomas consisten en al menos una membrana de bicapa lipídica que encierra un compartimento interno acuoso. Los liposomas se pueden caracterizar por el tipo de membrana y por el tamaño. Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV) tienen una sola membrana y, por lo general, miden entre 0,02 y 0,05 μm de diámetro; las vesículas unilamelares grandes (LUVS) suelen tener un tamaño superior a 0,05 μm. Las vesículas oligolamelares grandes y las vesículas multilamelares tienen múltiples capas de membrana, normalmente concéntricas, y suelen ser mayores de 0,1 μm. Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas más pequeñas contenidas dentro de una vesícula más grande, se denominan vesículas multivesiculares.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a formulaciones para su uso reivindicado que comprenden liposomas que contienen un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación, en las que la membrana del liposoma se formula para proporcionar un liposoma con mayor capacidad de carga. Como alternativa o adicionalmente, el conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación puede estar contenido dentro de la bicapa de liposomas del liposoma o estar adsorbido sobre la misma. Un conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación puede agregarse con un tensioactivo lipídico y transportarse dentro del espacio interno del liposoma; en estos casos, la membrana de liposomas está formulada para resistir los efectos perturbadores del agregado de agente activo-tensioactivo.

Según una forma de realización de la presente divulgación, la bicapa lipídica de un liposoma contiene lípidos derivatizados con poli(etilenglicol) (PEG), de tal manera que las cadenas de PEG se extienden de la superficie interior de la bicapa lipídica al espacio interior encapsulado por el liposoma, y se extienden del exterior de la bicapa lipídica al entorno circundante.

Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente divulgación se encuentran en forma solubilizada. Los agregados de tensioactivo y agente activo (tales como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) pueden estar atrapados dentro del espacio interior de los liposomas según la presente divulgación. Un tensioactivo actúa dispersando y solubilizando el agente activo, y se puede seleccionar de entre cualquier tensioactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, incluidos, pero sin limitación, lisofosfatidilcolinas biocompatibles (LPG) de diferentes longitudes de cadena (por ejemplo, de aproximadamente C14 a aproximadamente C20). Los lípidos derivatizados con polímeros, tales como los PEG-lípidos, también se pueden utilizar para la formación de micelas, dado que actuarán inhibiendo la fusión de micelas/membranas, y dado que la adición de un polímero a las moléculas de tensioactivo disminuye la CMC del tensioactivo y ayuda en la formación de micelas. Se prefieren los tensioactivos con CMO en el intervalo micromolar; pueden utilizarse tensioactivos de CMC superior para preparar micelas atrapadas dentro de los liposomas de la presente divulgación.

Los liposomas según la presente divulgación pueden prepararse mediante cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.235.871; la solicitud PCT publicada WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104; y Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Ámsterdam, 1993. Por ejemplo, los liposomas de la presente divulgación se pueden preparar mediante la difusión de un lípido derivatizado con un polímero hidrófilo en liposomas preformados, tal como mediante la exposición de liposomas preformados a micelas compuestas de

polímeros injertados con lípidos, a concentraciones de lípidos correspondientes al porcentaje molar final de lípidos derivatizados que se desea en el liposoma. Los liposomas que contienen un polímero hidrófilo también se pueden formar mediante técnicas de homogeneización, hidratación de campo lipídico o extrusión, tal como se sabe en la técnica.

5 En otro procedimiento de formulación de ejemplo, el agente activo se dispersa en primer lugar mediante sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro tensioactivo de CMC baja (incluidos los lípidos injertados con polímeros) que solubiliza fácilmente las moléculas hidrófobas. La suspensión micelar resultante del agente activo se utiliza después para rehidratar una muestra de lípidos seca que contiene un porcentaje molar adecuado de lípido injertado con polímero, o colesterol. A continuación, la suspensión de lípidos y agente activo se transforma en liposomas utilizando técnicas de extrusión conocidas en la técnica, y los liposomas resultantes se separan de la solución no encapsulada mediante separación en columna estándar.

10 15 En un aspecto de la presente divulgación, los liposomas se preparan para que tengan tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaño seleccionado. Un procedimiento eficaz de dimensionamiento implica la extrusión de una suspensión acuosa de los liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana se corresponderá aproximadamente con los tamaños más grandes de liposomas producidos por extrusión a través de esa membrana. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.737.323 (12 de abril de 1988). En determinadas formas de realización, pueden utilizarse reactivos tales como DharmaFECT® y Lipofectamine® para introducir polinucleótidos o proteínas en las células.

20 25 30 35 40 Las características de liberación de una formulación para su uso en la presente divulgación dependen del material de encapsulación, la concentración del fármaco encapsulado y la presencia de modificadores de liberación. Por ejemplo, la liberación se puede manipular para que dependa del pH, por ejemplo, utilizando un revestimiento sensible al pH que se libera solo a un pH bajo, como en el estómago, o a un pH más alto, como en el intestino. Se puede usar un recubrimiento entérico para evitar que se produzca la liberación hasta después del paso por el estómago. Se pueden utilizar múltiples recubrimientos o mezclas de cianamida encapsuladas en diferentes materiales para obtener una liberación inicial en el estómago, seguida de una liberación posterior en el intestino. La liberación también se puede manipular mediante la inclusión de sales o agentes formadores de poros, que pueden aumentar la absorción de agua o la liberación del fármaco por difusión desde la cápsula. También se pueden usar excipientes que modifican la solubilidad del fármaco para controlar la velocidad de liberación. También se pueden incorporar agentes que mejoran la degradación de la matriz o la liberación de la matriz. Pueden añadirse al fármaco, añadirse como una fase separada (es decir, en forma de partículas) o pueden disolverse conjuntamente en la fase polimérica según el compuesto. En la mayor parte de los casos, la cantidad deberá encontrarse entre el 0,1 y el 30 por ciento (p/p de polímero). Los tipos de potenciadores de la degradación incluyen sales inorgánicas tales como sulfato de amonio y cloruro de amonio, ácidos orgánicos tales como ácido cítrico, ácido benzoico y ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de zinc e hidróxido de zinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y tensioactivos tales como Tween® y Plurónico®. Los agentes formadores de poros que añaden microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua tales como sales inorgánicas y azúcares) se añaden en forma de partículas. El intervalo se encuentra normalmente entre el uno y el treinta por ciento (p/p de polímero).

45 La absorción también se puede manipular alterando el tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto se puede lograr, por ejemplo, recubriendo la partícula con, o seleccionando como material de encapsulación, un polímero adhesivo para mucosas. Los ejemplos incluyen la mayor parte de los polímeros con grupos carboxilo libres, tales como quitosano, celulosas y especialmente poliacrilatos (tal como se utiliza en el presente documento, poliacrilatos se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados, tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

50 55 60 Un conjugado de oligómero antisentido puede formularse de forma que esté contenido dentro de, o adaptado para que se libere por, un dispositivo o implante quirúrgico o médico. En determinados aspectos, un implante puede recubrirse o tratarse de otro modo con un conjugado de oligómero antisentido. Por ejemplo, se pueden usar hidrogeles u otros polímeros, tales como polímeros biocompatibles y/o biodegradables, para recubrir un implante con las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación (es decir, la composición se puede adaptar para su uso con un dispositivo médico utilizando un hidrogel u otro polímero). Los polímeros y copolímeros para el recubrimiento de dispositivos médicos con un agente son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de implantes incluyen, pero sin limitación, endoprótesis vasculares, endoprótesis vasculares liberadoras de fármacos, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéteres de diálisis, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas, marcapasos cardíacos, desfibriladores cardioversores implantables, agujas intravenosas, dispositivos para la consolidación y la formación de huesos, tales como alfileres, tornillos, placas y otros dispositivos, y matrices de tejido artificial para la cicatrización de heridas.

65 Además de los procedimientos proporcionados en el presente documento, los conjugados de oligómero antisentido para su uso según la divulgación pueden formularse para su administración de cualquier forma conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros productos farmacéuticos. Los conjugados de oligómero antisentido y sus formulaciones correspondientes pueden administrarse solos o en combinación con otras estrategias

terapéuticas en el tratamiento de la distrofia muscular, tales como el trasplante de mioblastos, terapias con células madre, administración de antibióticos aminoglucosídicos, inhibidores de proteasomas y terapias de regulación al alza (por ejemplo, regulación al alza de la utrofina, un parálogo autosómico de la distrofina).

5 En algunas formas de realización, el agente terapéutico adicional puede administrarse antes, simultáneamente o posteriormente a la administración del conjugado de oligómero antisentido de la presente divulgación. Por ejemplo, los conjugados de oligómero antisentido se pueden administrar en combinación con un esteroide y/o un antibiótico. En determinadas formas de realización, los conjugados de oligómero antisentido se administran a un paciente que se encuentra en terapia esteroidea de base (por ejemplo, terapia esteroidea de base intermitente o crónica/continua). Por ejemplo, en algunas formas de realización, el paciente se ha tratado con un corticosteroide antes de la administración de un oligómero antisentido y continúa recibiendo la terapia esteroidea. En algunas formas de realización, el esteroide es glucocorticoide o prednisona.

10 Se pretende que las vías de administración descritas sean solo una guía, dado que un médico experto podrá determinar fácilmente la vía óptima de administración y la dosificación para cualquier animal y afección particular. Se han intentado múltiples enfoques para introducir nuevo material genético funcional en las células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedmann (1989) Science, 244: 1275-1280). Estos enfoques incluyen la integración del gen que se va expresar en retrovirus modificados (Friedmann (1989) anteriormente; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suplemento: 5074S-5079S); integración en vectores no retrovirales (por ejemplo, vectores virales adenoasociados) (Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252: 431-434); o la administración de un transgén unido a un elemento potenciador-promotor heterólogo a través de liposomas (Friedmann (1989), anteriormente); Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278-281; Nabel et al. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; y Wang y Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855); acoplado a sistemas de transporte específicos de ligando basados en cationes (Wu y Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) o el uso de vectores de expresión de ADN desnudo (Nabel et al. (1990), anteriormente; Wolff et al. (1990) Science, 247: 1465-1468). La inyección directa de transgenes en el tejido produce solo expresión localizada (Rosenfeld (1992) anteriormente; Rosenfeld et al. (1991) anteriormente; Brigham et al. (1989) anteriormente; Nabel (1990) anteriormente; y Hazinski et al. (1991) anteriormente). El grupo de Brigham et al. (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 y Clinical Research (1991) 39 (resumen)) informó sobre la transfección *in vivo* solo de pulmones de ratones después de la administración intravenosa o intratraqueal de un complejo de liposomas de ADN. Un ejemplo de un artículo de revisión de procedimientos de terapia génica humana es: Anderson, Science (1992) 256: 808-813.

15 En una forma de realización adicional, las composiciones farmacéuticas para su uso en la divulgación pueden comprender adicionalmente un carbohidrato tal como se proporciona en Han et al., Nat. Comms. 7, 10981 (2016). En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender el 5% de un carbohidrato de hexosa. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la divulgación puede comprender el 5% de glucosa, el 5% de fructosa o el 5% de manosa. En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender el 2,5% de glucosa y el 2,5% de fructosa. En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender un carbohidrato seleccionado de: 20 arabinosa presente en una cantidad del 5% en volumen, glucosa presente en una cantidad del 5% en volumen, sorbitol presente en una cantidad del 5% en volumen, galactosa presente en una cantidad del 5% en volumen, fructosa presente en una cantidad del 5% en volumen, xilitol presente en una cantidad del 5% en volumen, manosa presente en una cantidad del 5% en volumen, una combinación de glucosa y fructosa cada una presente en una cantidad de 2,5% en volumen, y una combinación de glucosa presente en una cantidad de 5,7% en volumen, fructosa presente en una cantidad de 2,86% en volumen y xilitol presente en una cantidad de 1,4% en volumen.

#### IV. Usos

##### *Restauración del marco de lectura de distrofina mediante la omisión de exones*

25 La forma más leve de distrofinopatía conocida como BMD, que está provocada por mutaciones dentro de marco, sugiere un enfoque terapéutico potencial para el tratamiento de la DMD provocada por mutaciones fuera de marco en el gen de la distrofina. La capacidad para convertir una mutación fuera de marco en una mutación dentro de marco preservaría hipotéticamente el marco de lectura del ARNm y produciría una proteína distrofina internamente acortada pero funcional. Los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación se diseñaron para alcanzar este objetivo.

30 La hibridación de la PMO con la secuencia de pre-ARNm diana interfiere en la formación del complejo de empalme de pre-ARNm y elimina el exón 45 del ARNm maduro. La estructura y la conformación de los conjugados de oligómero antisentido de la divulgación permiten el emparejamiento de bases específico de secuencia con la secuencia complementaria. Por un mecanismo similar, eteplirsén, por ejemplo, que es un PMO que se diseñó para la omisión del exón 51 del pre-ARNm de la distrofina, permite el emparejamiento de bases específico de secuencia con la secuencia complementaria contenida en el exón 51 del pre-ARNm de la distrofina.

35 El ARNm de distrofina normal que contiene los 79 exones producirá la proteína distrofina normal. El gráfico de la figura 1 muestra una pequeña sección del pre-ARNm y el ARNm maduro de la distrofina, desde el exón 47 hasta el exón 53. La forma de cada exón muestra cómo se dividen los codones entre los exones; cabe señalar que un codón consta de

tres nucleótidos. Los exones de forma rectangular comienzan y terminan con codones completos. Los exones en forma de flecha comienzan con un codón completo pero terminan con un codón dividido, que contiene solo el nucleótido Nº 1 del codón. Los nucleótidos Nº 2 y Nº 3 de este codón están contenidos en el exón posterior que comenzará con forma de cheurón.

- 5 El ARNm de la distrofina que carece de exones completos del gen de la distrofina generalmente produce DMD. El gráfico de la figura 2 ilustra un tipo de mutación genética (deleción del exón 50) que se sabe que produce DMD. Dado que el exón 49 termina en un codón completo y el exón 45 comienza con el segundo nucleótido de un codón, el marco de lectura después del exón 49 se desplaza, lo que da como resultado un marco de lectura de ARNm fuera de marco y la incorporación de aminoácidos incorrectos cadena abajo de la mutación. La ausencia subsiguiente de un dominio de unión de distroglicano C-terminal funcional da como resultado la producción de una proteína distrofina inestable.
- 10 El eteplirsén produce la omisión del exón 51 para restaurar el marco de lectura del ARNm. Dado que el exón 49 termina en un codón completo y el exón 52 comienza con el primer nucleótido de un codón, la delección del exón 45 restaura el marco de lectura, lo que da como resultado la producción de una proteína distrofina acortada internamente con un sitio de unión de distroglicano intacto, similar a una mutación de BMD "en marco" (figura 3).
- 15 La viabilidad de mejora del fenotipo DMD mediante la omisión de exones para restaurar el marco de lectura abierto del ARNm de la distrofina está respaldada por investigaciones no clínicas. Numerosos estudios en modelos animales distróficos de DMD han demostrado que la restauración de la distrofina mediante la omisión de exones conduce a mejoras fiables en la fuerza y la función muscular (Sharp 2011; Yokota 2009; Wu 2008; Wu 2011; Barton-Davis 1999; Goyenvalle 2004; Gregorevic 2006; Yue 2006; Welch 2007; Kawano 2008; Reay 2008; van Putten 2012). Un ejemplo convincente de esto proviene de un estudio en el que se compararon los niveles de distrofina después de la terapia de omisión de exones (usando un PMO) con la función muscular en el mismo tejido. En ratones mdx distróficos, los músculos tibiales anteriores (TA) tratados con un PMO específico de ratón mantuvieron ~75% de su capacidad de fuerza máxima después de las contracciones inductoras de tensión, mientras que los músculos TA contralaterales no tratados mantuvieron solo ~25% de su capacidad de fuerza máxima ( $p < 0,05$ ) (Sharp 2011). En otro estudio, 3 perros CXMD distróficos recibieron, a los 2-5 meses de edad, terapia de omisión de exones utilizando un PMO específico para su mutación genética una vez a la semana durante 5 a 7 semanas o cada dos semanas durante 22 semanas.
- 20 30 Después de la terapia de omisión de exones, los 3 perros mostraron una amplia expresión de distrofina en todo el cuerpo en el músculo esquelético, y mantuvieron o mejoraron la deambulación (prueba de carrera de 15 m) con respecto al valor basal. Por el contrario, perros CXMD no tratados emparejados por edad mostraron una marcada disminución en la deambulación a lo largo del transcurso del estudio (Yokota 2009).
- 35 40 45 50 55 60 65 Se demostró que los PMO tienen más actividad de omisión de exones en concentraciones equimolares que los fosforotioatos tanto en ratones mdx como en el modelo de ratón con DMD humanizada (hDMD), que expresa el transcripto completo de DMD humana (Heemskirk 2009). Los experimentos *in vitro* que utilizan la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) e inmunotransferencia Western (WB) en células musculares esqueléticas humanas normales o células musculares de pacientes con DMD con diferentes mutaciones susceptibles a la omisión del exón 51 identificaron el eteplirsén (un PMO) como un potente inductor de la omisión del exón 51. La omisión del exón 51 inducida por eteplirsén se ha confirmado *in vivo* en el modelo de ratón hDMD (Arechavala-Gomeza 2007).
- Los resultados clínicos para analizar el efecto de un conjugado de oligómero antisentido que es complementario a una región diana del exón 45 del pre-ARNm de distrofina humana e induce la omisión del exón 45 incluyen el porcentaje de fibras positivas para distrofina (PDPF), la prueba de caminata de seis minutos (6MWT), la pérdida de deambulación (LOA), evaluación ambulatoria de North Star (NSAA), pruebas de función pulmonar (PFT), capacidad para levantarse (desde una posición supina) sin apoyo externo, producción de distrofina *de novo* y otras medidas funcionales.
- En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de Fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la producción de distrofina en un sujeto primate que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45. En determinadas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de Fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la restauración de un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de proteína distrofina en un sujeto primate con distrofia muscular de Duchenne (DMD) que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45. La producción de proteínas se puede medir mediante la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), análisis de inmunotransferencia Western o inmunohistoquímica (IHC).
- En algunas formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de Fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de DMD en un sujeto que lo necesite, en el que el sujeto tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45. En diversas formas de realización, el tratamiento del sujeto se mide por el retardo de la progresión de la enfermedad. En algunas formas de realización, el tratamiento del sujeto se mide por el mantenimiento de la deambulación en el sujeto o la reducción de la pérdida de deambulación en el sujeto. En algunas formas de realización, la deambulación se mide usando la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT). En determinadas formas de realización,

la deambulación se mide usando la evaluación ambulatoria de North Start (NSAA).

En varias formas de realización, la presente divulgación proporciona un conjugado de oligómero antisentido de Fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el mantenimiento de la función pulmonar o en la reducción de la pérdida de la función pulmonar en un sujeto primate con DMD, en el que el sujeto tiene una mutación del gen de DMD que es susceptible a la omisión del exón 45. En algunas formas de realización, la función pulmonar se mide como presión espiratoria máxima (MEP). En determinadas formas de realización, la función pulmonar se mide como presión inspiratoria máxima (MIP). En algunas formas de realización, la función pulmonar se mide como capacidad vital Forzada (FVC).

En una forma de realización adicional, las composiciones farmacéuticas para su uso en la divulgación se pueden coadministrar con un carbohidrato, ya sea en la misma formulación o en una formulación aparte, tal como se proporciona en Han et al., Nat. Comms. 7, 10981 (2016). En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas para su uso en la divulgación se pueden administrar con el 5% de un carbohidrato de hexosa. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas para su uso en la divulgación se pueden coadministrar con el 5% de glucosa, el 5% de fructosa o el 5% de manosa. En determinadas formas de realización, las composiciones farmacéuticas para su uso en la divulgación se pueden administrar conjuntamente con el 2,5% de glucosa y el 2,5% de fructosa. En algunas formas de realización, la composición farmacéutica de la divulgación se puede coadministrar con un carbohidrato seleccionado de: arabinosa presente en una cantidad del 5% en volumen, glucosa presente en una cantidad del 5% en volumen, sorbitol presente en una cantidad del 5% en volumen, galactosa presente en una cantidad del 5% en volumen, fructosa presente en una cantidad del 5% en volumen, xilitol presente en una cantidad del 5% en volumen, manosa presente en una cantidad del 5% en volumen, una combinación de glucosa y fructosa presentes cada una en una cantidad del 2,5% en volumen, y una combinación de glucosa presente en una cantidad del 5,7% en volumen, fructosa presente en una cantidad del 2,86% en volumen y xilitol presente en una cantidad del 1,4% en volumen.

En diversas formas de realización, un conjugado de oligómero antisentido para su uso en la divulgación se coadministra con una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto antiinflamatorio no esteroideo. En algunas formas de realización, el compuesto antiinflamatorio no esteroideo es un inhibidor de NF- $\kappa$ B. Por ejemplo, en algunas formas de realización, el inhibidor de NF- $\kappa$ B puede ser CAT-1004 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En diversas formas de realización, el inhibidor de NF- $\kappa$ B puede ser un conjugado de salicilato y DHA. En algunas formas de realización, el inhibidor de NF- $\kappa$ B es CAT-1041 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En determinadas formas de realización, el inhibidor de NF- $\kappa$ B es un conjugado de salicilato y EPA. En varias formas de realización, el inhibidor de NF- $\kappa$ B es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas formas de realización, el compuesto antiinflamatorio no esteroideo es un inhibidor de TGF- $\beta$ . Por ejemplo, en determinadas formas de realización, el inhibidor de TGF- $\beta$  es HT-100.

### Ejemplos

Materiales y procedimientos

#### *Condiciones de tratamiento de cultivo de células y tejidos*

Se utilizaron miocitos humanos diferenciados (ZenBio, Inc.) para medir la omisión de exones. Específicamente, los mioblastos (ZenBio, Inc., SKB-F) se cultivaron hasta una confluencia del 80-90% a 37 °C y el 5% de CO<sub>2</sub> en medios de cultivo (SKB-M; ZenBio, Inc.). La diferenciación se inició reemplazando los medios de cultivo por medios de diferenciación (SKM-D; ZenBio, Inc.). Para analizar la omisión del exón 45, se sembraron 1 x 10<sup>4</sup> células diferenciadas en una placa de 24 pocillos y se añadió a cada pocillo 1 ml de medio de diferenciación (SKM-D; ZenBio, Inc.) que contenía diversas concentraciones de PMO o PPMO y se incubó durante 96 horas.

Para el análisis por inmunotransferencia Western, el tejido se homogeneizó con tampón de homogeneización (SDS al 4%, urea 4 M, tris-HCl 125 mM (pH 6,8)) a una relación de secciones de tejido de 9 a 18 x 20 μm a aproximadamente

5 mm de diámetro en 133 µl de tampón. El lisado correspondiente se recogió y se sometió a cuantificación de proteínas utilizando el kit de ensayo de proteínas RC DC según las instrucciones del fabricante (BioRad Cat. 500-0122). Las muestras de extracto de tejido se diluyeron 1:10 usando un tampón de homogeneización para que se encontraran dentro del intervalo de la curva patrón de BSA. Las muestras se prepararon de manera que 35 µl de muestra contendrían la cantidad deseada de proteína utilizando 25 µl de lisado de proteínas, 7 µl de tampón de muestra NuPAGE LDS (Life Technologies Cat. NP0008, Carlsbad, California, Estados Unidos) y 3 µl de agente reductor NuPAGE (10x) (Life Technologies Cat. NP0004). Después de calentar las muestras de proteínas durante 5 minutos a 95 °C, las muestras se centrifugaron y el sobrenadante se cargó en un minigel, 3-8% de trisacetato de poliacrilamida, NuPAGE Novex, 10 pocillos, 1 mm (Life Technologies Cat. EA0375) a un máximo de 50 µg de carga proteica total por carril. El gel se corrió a 150 voltios a temperatura ambiente hasta que el frente de tinte se salió del gel. Los geles de proteínas resultantes se transfirieron a membranas de PVDF (Life Technologies Cat. LC2007) durante 75 minutos a temperatura ambiente con 30 voltios utilizando tampón de transferencia NuPAGE (Life Technologies NP006-1), 10% de metanol y 0,1% de antioxidante NuPAGE (Life Technologies NP0005).

15      Después de la transferencia de proteínas, las membranas de PVDF se sumergieron en tampón TTBS (IX TBS (Amresco Cat. J640-4L), 0,1% (v/v) de tween-20). Las membranas se transfirieron a tampón de bloqueo (leche descremada en polvo al 5% (p/v) (Lab Scientific Cat. M0841) en TTBS) y se remojaron durante la noche a 4 °C con un balanceo suave. Después del bloqueo, las membranas se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente en DYS1 (Leica Cat. NCL-DYS1) diluido 1:20 utilizando tampón de bloqueo, o 20 minutos a temperatura ambiente en anticuerpo anti- $\alpha$ -actinina (Sigma-Aldrich Cat. NA931V) diluido 1:100.000 con tampón de bloqueo, operación seguida de seis lavados (cinco minutos cada uno con TTBS). La IgG anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano picante (GE Healthcare Cat. NA931V) se diluyó 1:40.000 utilizando un tampón de bloqueo y se añadió a las membranas durante 45 minutos (DYS1) o 15 minutos ( $\alpha$ -actinina), operación seguida nuevamente de seis lavados. Usando el kit de detección ECL Prime Western (GE Healthcare Cat. RPN2232), la película se expuso al gel y se desarrolló en consecuencia. La película desarrollada se escaneó y se analizó utilizando el programa informático ImageQuant TL Plus (versión 8.1) y se realizó un análisis de regresión lineal usando el programa informático Graphpad.

30      Cada gel de inmunotransferencia Western incluye una curva patrón de distrofina de 4 puntos preparada utilizando proteína total extraída de tejido, por ejemplo, extracto de cuádriceps, diafragma o corazón de ratón, o cuádriceps, diafragma o músculo liso (GI) de NHP) diluida al 64%, 16%, 4%, 1% y 0,25% y se añadió a tejido DMD (cuádriceps, diafragma o corazón de ratón MDX). Las muestras de la curva patrón se procesaron tal como se ha descrito anteriormente. Los niveles de proteína de distrofina como porcentaje de los niveles de distrofina de tipo silvestre (%WT) se determinaron comparando las intensidades de la banda de distrofina con la curva patrón del gel.

### 35      Análisis por RT-PCR

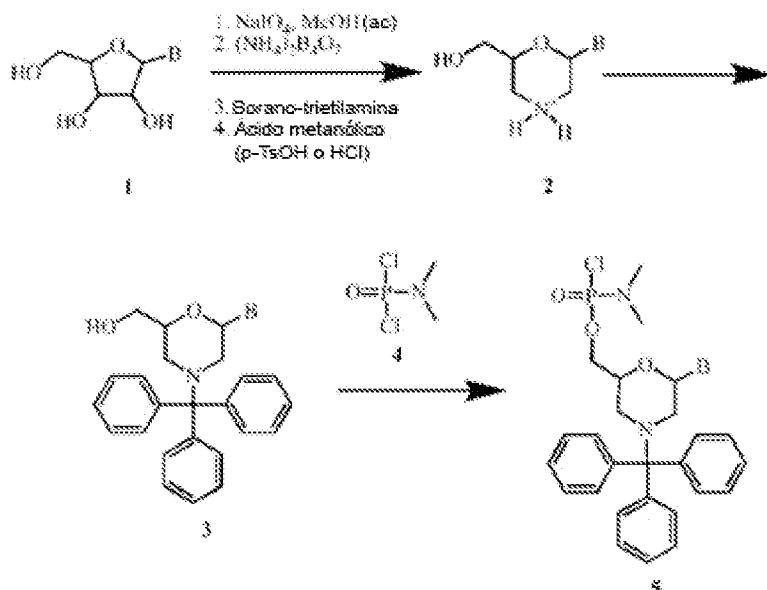
Para el análisis por RT-PCR, se aisló el ARN de las células utilizando el kit de centrifugado Illustra GE siguiendo el protocolo del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se determinaron utilizando un NanoDrop.

40      Después de someter el ARN a RT-PCR, las muestras se analizaron utilizando una máquina Caliper, que usa electroforesis capilar en gel. El porcentaje de omisión de exón se calculó utilizando la ecuación siguiente: (área bajo la curva para bandas omitidas)/(suma del área bajo la curva para bandas omitidas y no omitidas) x100.

### 45      Inmunohistoquímica: tinción de distrofina:

Se usaron secciones de tejido congeladas de 10 micrómetros del cuádriceps de ratón para detectar distrofina mediante el anticuerpo primario de distrofina (dilución 1:250, conejo, Abcam, Nº de cat. ab15277) en suero de cabra al 10% + BSA al 1% en PBS y anticuerpo secundario Alexa-Fluoro 488 de cabra anticonejo (dilución de 1:1000) en suero de cabra al 10% + BSA al 1%.

### 50      Preparación de subunidades de morfolino



Esquema 1: Ruta de síntesis general para subunidades de PMO

Con referencia al esquema 1, en el que B representa un resto de emparejamiento de bases, las subunidades de morfolino pueden prepararse a partir del ribonucleósido (1) correspondiente, tal como se muestra. La subunidad de morfolino (2) puede protegerse opcionalmente por reacción con un precursor de un grupo protector adecuado, por ejemplo, cloruro de trítilo. El grupo protector 3' generalmente se elimina durante la síntesis de oligómeros en estado sólido tal como se describe con más detalle a continuación. El resto de emparejamiento de bases puede protegerse adecuadamente para la síntesis de oligómeros en fase sólida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoílo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina y pivaloiloximetilo para hipoxantina (1).

El grupo pivaloiloximetilo se puede introducir en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina. Aunque puede emplearse una subunidad de hipoxantina no protegida, los rendimientos en las reacciones de activación son muy superiores cuando la base está protegida. Otros grupos protectores adecuados incluyen los descritos en la patente de Estados Unidos Nº 8.076.476.

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

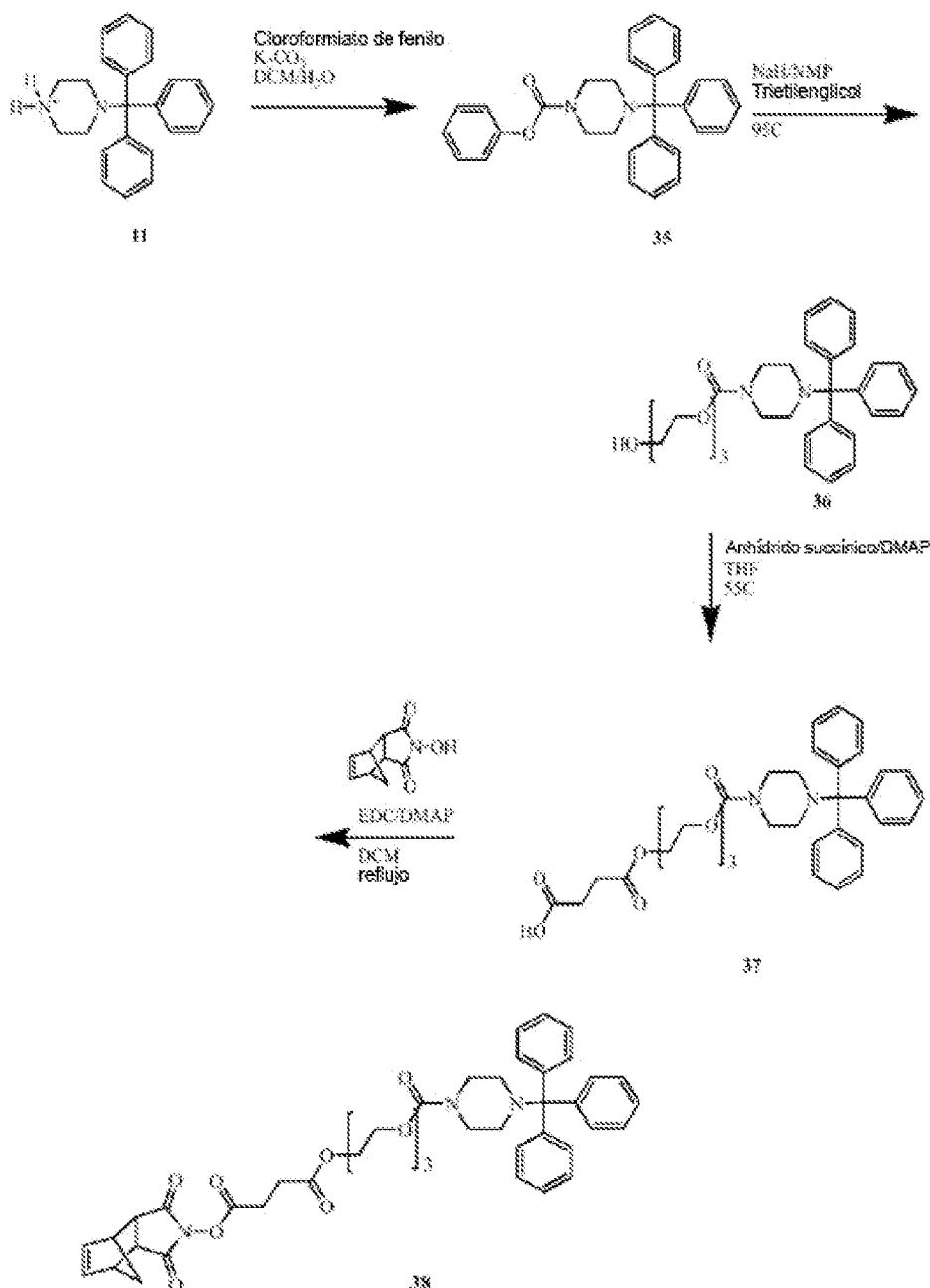
Los compuestos de estructura 4 se pueden preparar usando multitud de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. A continuación, el acoplamiento con el resto morfolino procede tal como se ha indicado anteriormente.

Los compuestos de estructura 5 se pueden usar en la síntesis de oligómeros en fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces entre subunidades. Dichos procedimientos son bien conocidos en la técnica. Dicho brevemente, un compuesto de estructura 5 puede modificarse en el extremo 5' para que contenga un enlazador a un soporte sólido. Una vez soportado, se elimina el grupo protector de 5' (por ejemplo, trítilo en el extremo 3') y la amina libre se hace reaccionar con un resto de fósforo activado de un segundo compuesto de estructura 5. Esta secuencia se repite hasta que se obtiene el oligo de longitud deseada. El grupo protector en el extremo terminal 3' puede eliminarse o dejarse si se desea una modificación en 3'. El oligo se puede retirar del soporte sólido utilizando multitud de procedimientos o un tratamiento de ejemplo con una base para escindir el enlace con el soporte sólido.

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

#### *Preparación de oligómeros de morfolino*

La preparación de los compuestos de la divulgación se realiza utilizando el siguiente protocolo según el esquema 2:



5      Preparación de fenilcarbamato de tritilpiperazina 35: A una suspensión enfriada de compuesto 11 en diclorometano (6 ml/g 11) se añadió una solución de carbonato de potasio (3,2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se añadió lentamente una solución de cloroformato de fenilo (1,03 eq) en diclorometano (2 g de cloroformato de fenilo). La mezcla de reacción se calentó a 20 °C. Una vez completada la reacción (1-2 h), se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto 35 se aisló por cristalización a partir de acetonitrilo.

10     Preparación de alcohol de carbamato 36: Se suspendió hidruro de sodio (1,2 eq) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidruro de sodio). A esta suspensión se añadieron trietylenglicol (10,0 eq) y compuesto 35 (1,0 equivalente). La suspensión resultante se calentó a 95 °C. Una vez completada la reacción (1-2 h), la mezcla se enfrió a 20 °C. A esta mezcla se añadió diclorometano al 30%/metil terc-butil éter (v:v) y agua. La capa orgánica que contenía el producto se lavó sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso y cloruro sódico acuoso saturado. El producto 36 se aisló por cristalización en diclorometano/metil terc-butil éter/heptano.

15     Preparación del ácido de cola 37: A una solución de compuesto 36 en tetrahidrofuran (7 ml/g 36) se añadió anhídrido

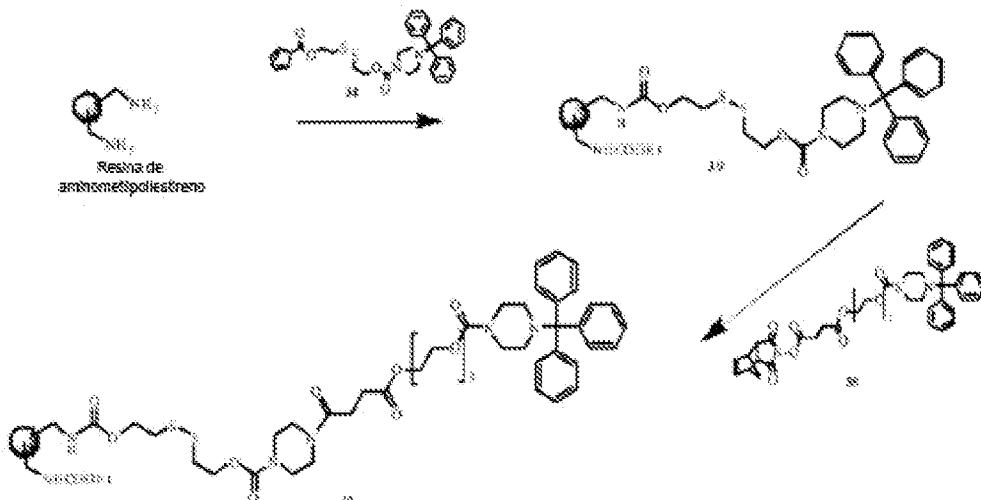
5 succínico (2,0 eq) y DMAP (0,5 eq). La mezcla se calentó a 50 °C. Una vez completada la reacción (5 h), la mezcla se enfrió a 20 °C y se ajustó a pH 8,5 con NaHCO<sub>3</sub> acuoso. Se añadió metil terc-butil éter y el producto se extrajo en la fase acuosa. Se añadió diclorometano y la mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contenía el producto se lavó con una mezcla de tampón de citrato de pH = 3 y cloruro de sodio acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de 37 se usó sin aislamiento en la preparación del compuesto 38.

10 Preparación de 38: A la solución del compuesto 37 se añadió imida de ácido N-hidroxi-5-norborneno-2,3-dicarboxílico (HONB) (1,02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq) y después clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1,1 eq). La mezcla se calentó a 55 °C. Una vez completada la reacción (4-5 horas), la mezcla se enfrió a 20 °C y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,2 M/salmuera 1:1 y salmuera. La solución de diclorometano se sometió a intercambio de disolvente a acetona y después a N,N-dimetilformamida, y el producto se aisló por precipitación en acetona/N,N-dimetilformamida en cloruro de sodio acuoso saturado. El producto bruto se volvió a suspender varias veces en agua para eliminar la N,N-dimetilformamida residual y las sales.

15 La introducción de la "cola" activada en la resina cargada con anclaje se realizó en dimetilimidazolidinona (DMI) mediante el procedimiento utilizado para la incorporación de las subunidades durante la síntesis en fase sólida.

#### Procedimiento A de síntesis de PMO: uso de anclaje de disulfuro

20



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

Este procedimiento se realizó en un recipiente para péptidos con camisa y silanizado (ChemGlass, NJ, Estados Unidos) con una frita de vidrio de porosidad gruesa (40-60 µm), agitador superior y llave de paso de teflón de 3 vías para permitir que el N<sub>2</sub> borbotee a través de la frita o una extracción al vacío.

25 Las etapas de tratamiento/lavado de resina en el siguiente procedimiento consisten en dos operaciones básicas: fluidización de resina o reactor de lecho agitado y extracción con disolvente/solución. Para la fluidización de la resina, la llave de paso se colocó para permitir que el N<sub>2</sub> fluyera hacia arriba a través de la frita y se añadió el tratamiento/lavado de resina especificado al reactor y se permitió que permeara y humedeciera completamente la resina. A continuación, se inició el mezclado y la suspensión de resina se mezcló durante el periodo de tiempo especificado. Para la extracción con disolvente/solución, se detuvo el mezclado y el flujo de N<sub>2</sub> y se puso en marcha la bomba de vacío y después se colocó la llave de paso para permitir la evacuación del tratamiento/lavado de resina a los desechos. Todos los volúmenes de tratamiento/lavado de resina fueron de 15 ml/g de resina, a menos que se indique lo contrario.

30 A la resina de aminometilpoliestireno (malla 100-200; ~1,0 mmol/g de carga basada en la sustitución de nitrógeno; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, Reino Unido, pieza Nº 1464-X799) en un recipiente para péptidos con camisa silanizado se añadió 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g de resina) y se dejó que la resina se hinchara con mezclado durante 1-2 horas. Después de la evacuación del disolvente de hinchamiento, la resina se lavó con diclorometano (2 x 1-2 min), diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Despues de la evacuación del lavado final, la resina se trató con una solución de anclaje de disulfuro 34 en 1-metil-2-pirrolidinona (0,17 M; 15 ml/g de resina, ~2,5 eq) y la mezcla de resina/reactivo se calentó a 45 °C durante 60 h. Al finalizar la reacción, se interrumpió el calentamiento y se evació la solución de anclaje y se lavó la resina con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina se trató con una solución de dicarbonato de dietilo al 10% (v/v) en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 min) y después se lavó con diclorometano (6 x 1-2 min). La resina 39

se secó bajo una corriente de N<sub>2</sub> durante 1-3 horas y después al vacío hasta peso constante ( $\pm 2\%$ ). Rendimiento: 110-150% del peso de resina original.

- 5 Determinación de la carga de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro: La carga de la resina (número de sitios reactivos potencialmente disponibles) se determina mediante un ensayo espectrométrico para el número de grupos trifenilmetilo (trítilo) por gramo de resina.
- 10 Se transfiere un peso conocido de resina seca ( $25 \pm 3$  mg) a un matraz aforado de 25 ml silanizado y se añaden ~5 ml de ácido trifluoroacético al 2% (v/v) en diclorometano. El contenido se mezcla agitando suavemente y después se dejan reposar durante 30 min. El volumen se lleva hasta 25 ml con ácido trifluoroacético adicional al 2% (v/v) en diclorometano y el contenido se mezcla completamente. Usando una pipeta de desplazamiento positivo, se transfiere una parte alícuota de la solución que contiene trítilo (500  $\mu$ l) a un matraz aforado de 10 ml y se lleva el volumen a 10 ml con ácido metanosulfónico.
- 15 15 El contenido de catión trítilo en la solución final se mide mediante absorbancia UV a 431,7 nm y la carga de resina se calcula en grupos trítilo por gramo de resina ( $\mu$ mol/g) utilizando los volúmenes, diluciones, coeficiente de extinción ( $\epsilon$ : 41  $\mu$ mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) y peso de resina apropiados. El ensayo se realiza por triplicado y se calcula una carga promedio.
- 20 20 El procedimiento de carga de resina en este ejemplo proporcionará resina con una carga de aproximadamente 500  $\mu$ mol/g. Se obtuvo una carga de 300-400 en  $\mu$ mol/g si la etapa de incorporación del anclaje de disulfuro se realiza durante 24 horas a temperatura ambiente.
- 25 25 Carga de cola: utilizando la misma configuración y los mismos volúmenes que para la preparación de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro, la cola se puede introducir en un soporte sólido. La resina cargada con anclaje se desprotegió en primer lugar en condiciones ácidas y el material resultante se neutralizó antes del acoplamiento. Para la etapa de acoplamiento, se utilizó una solución de 38 (0,2 M) en DMI que contenía 4-etilmorfolina (NEM, 0,4 M) en lugar de la solución de anclaje de disulfuro. Después de 2 h a 45 °C, la resina 39 se lavó dos veces con diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano y una vez con DCM. A la resina se añadió una solución de anhídrido benzoico (0,4 M) y NEM (0,4 M). Después de 25 min, la camisa del reactor se enfrió a temperatura ambiente y la resina se lavó dos veces con diisopropiletilamina al 5% en isopropanol al 25%/diclorometano y ocho veces con DCM. La resina 40 se filtró y se secó a alto vacío. La carga de resina 40 se define como la carga de la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro original 39 utilizada en la carga de cola.
- 30 30 Síntesis en fase sólida: Se prepararon oligómeros de morfolino en un sintetizador de péptidos automatizado Gilson AMS-422 en columnas de reacción de polipropileno Gilson de 2 ml (Nº de pieza 3980270). Se dispuso un bloque de aluminio con canales para el flujo de agua alrededor de las columnas cuando se montaron en el sintetizador. El AMS-422 añadirá alternativamente soluciones de reactivo/lavado, las mantendrá durante un periodo de tiempo específico y evacuará las columnas usando vacío.
- 35 35 40 Para oligómeros en el intervalo de hasta aproximadamente 25 subunidades de longitud, se prefiere la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con una carga cercana a 500  $\mu$ mol/g de resina. Para oligómeros más grandes, se prefiere la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con una carga de 300-400  $\mu$ mol/g de resina. Si se desea una molécula con cola 5', la resina que se ha cargado con cola se elige con las mismas pautas de carga.
- 45 45 50 Se prepararon las siguientes soluciones de reactivos:
- Solución de destilación: Ácido cianoacético al 10% (p/v) en diclorometano/acetonitrilo 4:1;
- Solución de neutralización: Diisopropiletilamina al 5% en diclorometano/isopropanol 3:1;
- 55 55 60 Solución de acoplamiento: Subunidad de morfolino activada 0,18 M (o 0,24 M para oligómeros que han crecido más de 20 subunidades) de la base y tipo de enlace deseados y N-etilmorfolina 0,4 M, en 1,3-dimetilimidazolidinona.
- Se utilizó diclorometano (DCM) como lavado de transición para separar los diferentes lavados de solución de reactivo.
- En el sintetizador, con el bloque ajustado a 42 °C, a cada columna que contenía 30 mg de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (o resina de cola) se le añadieron 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona y se dejó asentar a temperatura ambiente durante 30 min. Después de lavar con 2 ml de diclorometano 2 veces, se empleó el siguiente ciclo de síntesis:

Etapa	Volumen	Suministro	Tiempo de espera
Destilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destilación	1,5 ml	Colector	15 segundos

Etapa	Volumen	Suministro	Tiempo de espera
Destrililación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destrililación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destrililación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Destrililación	1,5 ml	Colector	15 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Acoplamiento	350-500 µl	Jeringuilla	40 minutos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos

Las secuencias de los oligómeros individuales se programaron en el sintetizador para que cada columna recibiera la solución de acoplamiento adecuada (A,C,G,T,I) en la secuencia adecuada. Cuando el oligómero presente en una columna hubo completado la incorporación de su subunidad final, la columna se retiró del bloque y se realizó un ciclo final manualmente con una solución de acoplamiento compuesta por cloruro de 4-metoxitrifenilmethyl (0,32 M en DMI) que contenía 0,89 M de 4-etilmorfolina.

5 Escisión de la resina y eliminación de bases y grupos protectores del esqueleto: después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Se añadió un ml de una solución de escisión que consistía en 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 M y trietilamina 0,73 M en 1-metil-2-pirrolidinona, se tapó la columna y se dejó asentar a temperatura ambiente durante 30 min. Pasado ese tiempo, la solución se drenó en un vial Wheaton de 12 ml. La resina muy encogida se lavó dos veces con 300 µl de solución de escisión. A la solución se añadieron 4,0 ml de amoniaco acuoso concentrado (almacenado a -20 °C), el vial se tapó herméticamente (con tapón de rosca revestido de teflón) y la mezcla se agitó para mezclar la solución. El vial se dispuso en un horno a 45 °C durante 16-24 h para efectuar la escisión de la base y de los grupos protectores del esqueleto.

10 15 Purificación del producto bruto: La solución de amonólisis en vial se retiró del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se diluyó con 20 ml de amoniaco acuoso al 0,28% y se hizo pasar a través de una columna de 2,5 x 10 cm que contenía resina Macroprep HQ (BioRad). Se usó un gradiente de sal (A: amoniaco al 0,28% con B: cloruro sódico 1 M en amoniaco al 0,28%; B al 0-100% en 60 min) para eluir el pico que contenía metoxitritilo. Las fracciones combinadas se agruparon y se procesaron adicionalmente en función del producto deseado.

20 25 Desmetoxitritilación de oligómeros de morfolino: las fracciones agrupadas de la purificación de Macroprep se trataron con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1 M para reducir el pH a 2,5. Después del mezclado inicial, las muestras se asentaron a temperatura ambiente durante 4 min, momento en el que se neutralizaron a pH 10-11 con amoniaco al 2,8%/agua. Los productos se purificaron mediante extracción en fase sólida (SPE).

30 Empaque en columna SPE y acondicionamiento: se empaqueta Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Filadelfia, PA) (3 ml) en columnas con frita de 20 ml (columnas de cromatografía BioRad Econo-Pac (732-1011)) y la resina se enjuaga con 3 ml de los siguientes: NH<sub>4</sub>OH al 0,28%/acetonitrilo al 80%; NaOH 0,5 M/etanol al 20%; agua; H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM/acetonitrilo al 80%; agua; NaOH 0,5/etanol al 20%; agua; NH<sub>4</sub>OH al 0,28%.

35 Purificación SPE: la solución de la demetoxitritilación se cargó en la columna y la resina se enjuagó tres veces con 3-6 ml de amoniaco acuoso al 0,28%. Se dispuso un vial de Wheaton (12 ml) debajo de la columna y el producto se eluyó mediante dos lavados con 2 ml de acetonitrilo al 45% en amoniaco acuoso al 0,28%.

Aislamiento del producto: Las soluciones se congelaron en hielo seco y los viales se dispusieron en un liofilizador para

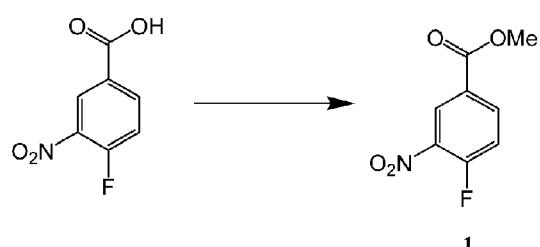
5 producir un polvo blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en agua, se filtraron a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Pall Life Sciences, filtro de jeringa Acrodisc de 25 mm, con una membrana HT Tuffryn de 0,2 micrómetros) utilizando una jeringa y se midió la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro UV para determinar las unidades DO del oligómero presente, así como también dispensar la muestra para el análisis. A continuación, las soluciones se volvieron a disponer en viales de Wheaton para su lyophilización.

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

Síntesis de PMO Procedimiento B: Uso de anclaje de NCP2

15 Síntesis de anclaje de NCP2:

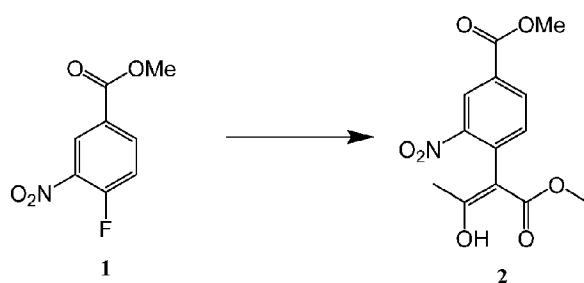
1. Preparación de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (1)



20 En un matraz de 100 l se cargaron 12,7 kg de ácido 4-fluoro-3-nitrobenzoico, se añadieron 40 kg de metanol y 2,82 kg de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se agitó a refluo (65 °C) durante 36 horas. La mezcla de reacción se enfrió a 0 °C. Se formaron cristales a 38 °C. La mezcla se mantuvo a 0 °C durante 4 horas y después se filtró en atmósfera de nitrógeno. El matraz de 100 l se lavó y la torta del filtro se lavó con 10 kg de metanol que se había enfriado a 0 °C. 25 La torta de filtro sólida se secó en el embudo durante 1 hora, se transfirió a bandejas y se secó en un horno de vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante de 13,695 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (100% de rendimiento; HPLC 99%).

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

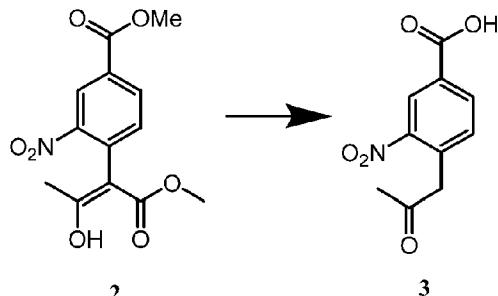
A. (Z)-4-(3-Hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de metilo (2)



35 En un matraz de 100 l se cargaron 3,98 kg de 4-fluoro-3-nitrobenzoato de metilo (1) de la etapa anterior, 9,8 kg de DMF, 2,81 kg de acetato de metilo. La mezcla se agitó y se enfrió a 0 °C. Se añadieron a la misma 3,66 kg de DBU a lo largo de un periodo de aproximadamente 4 horas mientras la temperatura se mantenía a 5 °C o menos. La mezcla se agitó durante 1 hora adicional. Al matraz de reacción se añadió una solución de 8,15 kg de ácido cítrico en 37,5 kg de agua purificada mientras la temperatura de reacción se mantenía a 15 °C o menos. Despues de la adición, 40 la mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos adicionales y después se filtró en atmósfera de nitrógeno. La torta de filtro húmeda se devolvió al matraz de 100 l junto con 14,8 kg de agua purificada. La suspensión se agitó durante 10 minutos y después se filtró. La torta húmeda se devolvió de nuevo al matraz de 100 l, se suspendió con 14,8 kg de agua purificada durante 10 minutos y se filtró hasta obtener (Z)-4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de metilo bruto.

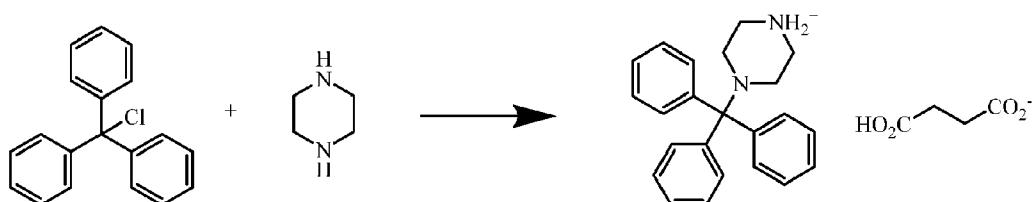
45

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



5 El (Z)-4-(3-hidroxi-1-metoxi-1-oxobut-2-en-2-il)-3-nitrobenzoato de metilo bruto se cargó en un matraz de reacción de  
100 l en atmósfera de nitrógeno. Se añadieron al mismo 14,2 kg de 1,4-dioxano y después se agitó. Se añadió a la  
mezcla una solución de 16,655 kg de HCl concentrado y 13,33 kg de agua purificada (HCl 6 M) a lo largo de un periodo  
de 2 horas mientras la temperatura de la mezcla de reacción se mantenía por debajo de 15 °C. Cuando se completó  
la adición, la mezcla de reacción se calentó a reflujo (80 °C) durante 24 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se  
filtró en atmósfera de nitrógeno. La torta de filtro sólida se trituró con 14,8 kg de agua purificada, se filtró, se trituró  
nuevamente con 14,8 kg de agua purificada y se filtró. El sólido se devolvió al matraz de 100 l con 39,9 kg de DCM y  
se sometió a reflujo con agitación durante 1 hora. Se añadieron 1,5 kg de agua purificada para disolver los sólidos  
restantes. La capa orgánica del fondo se separó en un matraz de 72 l precalentado, después se devolvió a un matraz  
de 100 l limpio y seco. La solución se enfrió a 0 °C, se mantuvo durante 1 hora y después se filtró. La torta de filtración  
sólida se lavó dos veces cada una con una solución de 9,8 kg de DCM y 5 kg de heptano, después se secó en el  
embudo. El sólido se transfirió a bandejas y se secó hasta un peso constante de 1,855 kg de ácido 3-nitro-4-(2-  
oxopropil)benzoico. Rendimiento global: 42% a partir del compuesto 1. HPLC 99,45%.

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

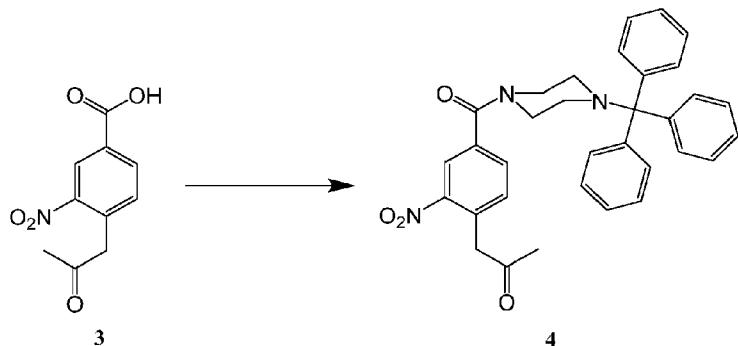


En un matraz con camisa de 72 l se cargaron en atmósfera de nitrógeno 1,805 kg de cloruro de trifenilmetilo y 8,3 kg de tolueno (solución de TPC). La mezcla se agitó hasta que se disolvieron los sólidos. A un matraz de reacción con camisa de 100 l se añadieron en atmósfera de nitrógeno 5,61 kg de piperazina, 19,9 kg de tolueno y 3,72 kg de metanol. La mezcla se agitó y se enfrió a 0 °C. A la misma se añadió lentamente en porciones la solución de TPC a lo largo de un periodo de 4 horas mientras la temperatura de reacción se mantenía a, o por debajo de, 10 °C. La mezcla se agitó durante 1,5 horas a 10 °C, después se dejó calentar a 14 °C. Se cargaron 32,6 kg de agua purificada en el matraz de 72 l, después se transfirió al matraz de 100 l mientras la temperatura interna del lote se mantenía a 20 °C +/- 5 °C. Se permitió que las capas se dividieran y la capa acuosa del fondo se separó y se almacenó. La capa orgánica se extrajo tres veces con 32 kg de agua purificada cada vez, y las capas acuosas se separaron y se combinaron con la solución acuosa almacenada.

35 La capa orgánica restante se enfrió a 18 °C y se añadió lentamente en porciones a la capa orgánica una solución de 847 g de ácido succínico en 10,87 kg de agua purificada. La mezcla se agitó durante 1,75 horas a 20 +/- 5 °C. La mezcla se filtró y los sólidos se lavaron con 2 kg de TBME y 2 kg de acetona y después se secaron en el embudo. La torta del filtro se trituró dos veces con 5,7 kg de acetona cada una y se filtró y se lavó con 1 kg de acetona entre trituraciones. El sólido se secó en el embudo, después se transfirió a bandejas y se secó en una estufa de vacío a temperatura ambiente hasta un peso constante de 2,32 kg de NTP. Rendimiento 80%.

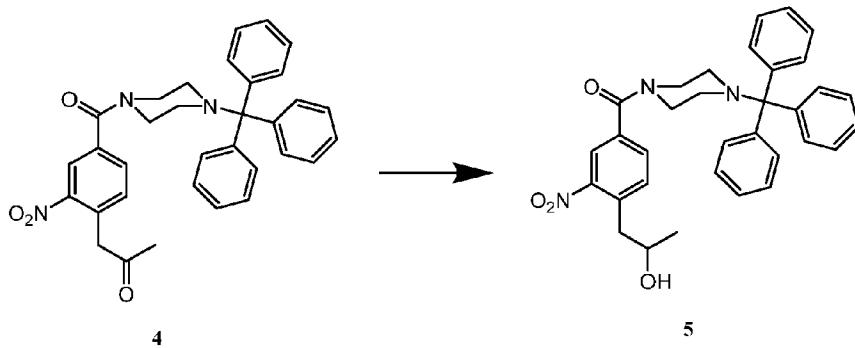
#### 4. Preparación de (4-(2-hidroxipropil)-3-nitrofenil)(4-tritilpiperazin-1-il)metanona

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



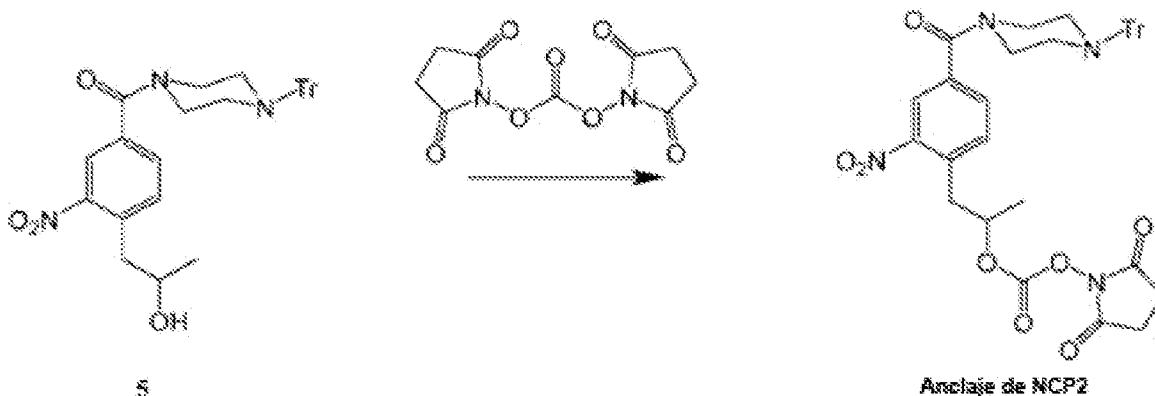
En un matraz con camisa de 100 l se cargaron en atmósfera de nitrógeno 2 kg de ácido 3-nitro-4-(2-oxopropil)benzoico (3), 18,3 kg de DCM y 1,845 kg de clorhidrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC.HCl). La solución se agitó hasta que se formó una mezcla homogénea. Se añadieron 3,048 kg de NTP a lo largo de un periodo de 30 minutos a temperatura ambiente y se agitó durante 8 horas. Se añadieron 5,44 kg de agua purificada a la mezcla de reacción y se agitó durante 30 minutos. Se permitió que las capas se separaran y la capa orgánica inferior que contenía el producto se drenó y se almacenó. La capa acuosa se extrajo dos veces con 5,65 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de 1,08 kg de cloruro sódico en 4,08 kg de agua purificada. Las capas orgánicas se secaron sobre 1,068 kg de sulfato de sodio y se filtraron. El sulfato de sodio se lavó con 1,3 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se suspendieron con 252 g de gel de sílice y se filtraron a través de un filtro de embudo que contenía un lecho de 252 g de gel de sílice. El lecho de gel de sílice se lavó con 2 kg de DCM. Las capas orgánicas combinadas se evaporaron en un evaporador rotatorio. Se añadieron 4,8 kg de THF al residuo y después se evaporó en el evaporador rotatorio hasta alcanzar 2,5 volúmenes de 1-(2-nitro-4-(4-tripiperazin-1-il)fenil)propan-2-ona bruta en THF.

B. Preparación de (4-(2-hidroxipropl)-3-nitrofenil)(4-tripiperazin-1-il)metanona (5)



En un matraz con camisa de 100 l se cargaron en atmósfera de nitrógeno 3600 g de 4 de la etapa anterior y 9800 g de THF. La solución agitada se enfrió a ≤ 5 °C. La solución se diluyó con 11.525 g de etanol y se añadieron 194 g de borohidruro de sodio a lo largo de un periodo de aproximadamente 2 horas a ≤ 5 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas adicionales a ≤ 5 °C. La reacción se inactivó con una solución de aproximadamente 1,1 kg de cloruro de amonio en aproximadamente 3 kg de agua mediante adición lenta para mantener la temperatura a ≤ 10 °C. La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos adicionales, se filtró para eliminar los compuestos inorgánicos y se recargó en un matraz con camisa de 100 l y se extrajo con 23 kg de DCM. La capa orgánica se separó y la acuosa se extrajo dos veces más con 4,7 kg de DCM cada vez. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con una solución de aproximadamente 800 g de cloruro sódico en aproximadamente 3 kg de agua, después se secaron sobre 2,7 kg de sulfato sódico. La suspensión se filtró y la torta de filtro se lavó con 2 kg de DCM. Los filtrados combinados se concentraron a 2,0 volúmenes, se diluyeron con aproximadamente 360 g de acetato de etilo y se evaporaron. El producto bruto se cargó en una columna de gel de sílice de 4 kg de sílice empaquetada con DCM en atmósfera de nitrógeno y se eluyó con 2,3 kg de acetato de etilo en 7,2 kg de DCM. Las fracciones combinadas se evaporaron y el residuo se recogió en 11,7 kg de tolueno. La solución de tolueno se filtró y la torta del filtro se lavó dos veces con 2 kg de tolueno cada vez. La torta del filtro se secó hasta un peso constante de 2,275 kg del compuesto 5 (46% de rendimiento del compuesto 3), HPLC 96,99%.

5. Preparación de (1-(2-nitro-4-(4-trifenilmetilpiperazin-1-carbonil)fenil)propano-2-il)carbonato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (anclaje de NCP2)



En un matraz con camisa de 100 l se cargaron en atmósfera de nitrógeno 4,3 kg del compuesto 5 (peso ajustado en función del tolueno residual por RMN de H<sup>1</sup>; todos los reactivos desde este punto en adelante se escalaron en consecuencia) y 12,7 kg de piridina. Se cargaron al mismo 3,160 kg de DSC (78,91% en peso por RMN de H<sup>1</sup>) manteniendo mientras la temperatura interna a ≤ 35 °C. La mezcla de reacción se envejeció durante aproximadamente 22 horas a temperatura ambiente y después se filtró. La torta del filtro se lavó con 200 g de piridina. En dos lotes, cada uno de los cuales comprende ½ del volumen de filtrado, el lavado de filtrado se cargó lentamente en un matraz con camisa de 100 l que contenía una solución de aproximadamente 11 kg de ácido cítrico en aproximadamente 50 kg de agua y se agitó durante 30 minutos para permitir la precipitación del sólido. El sólido se recogió con un filtro de embudo, se lavó dos veces con 4,3 kg de agua por lavado y se secó en el filtro de embudo al vacío.

Los sólidos combinados se cargaron en un matraz con camisa de 100 l y se disolvieron en 28 kg de DCM y se lavaron con una solución de 900 g de carbonato de potasio en 4,3 kg de agua. Después de 1 hora, se permitió que las capas se separaran y se retiró la capa acuosa. La capa orgánica se lavó con 10 kg de agua, se separó y se secó sobre 3,5 kg de sulfato sódico. El DCM se filtró, se evaporó y se secó al vacío hasta obtener 6,16 kg de anclaje de NCP2 (114% de rendimiento).

#### Síntesis de resina cargada con anclaje de NCP2

En un reactor de síntesis en fase sólida de 75 l con una llave de paso de teflón se cargaron aproximadamente 52 l de NMP y 2300 g de resina de aminometilpoliestireno. La resina se agitó en NMP para que se hinchara durante aproximadamente 2 horas y después se drenó. La resina se lavó dos veces con aproximadamente 4 l de DCM por lavado, después dos veces con 39 l de solución de neutralización por lavado y a continuación dos veces con 39 l de DCM por lavado. La solución de anclaje de NCP2 se añadió lentamente a la solución de resina en agitación, se agitó durante 24 horas a temperatura ambiente y se drenó. La resina se lavó cuatro veces con 39 l de NMP por lavado y seis veces con 39 l de DCM por lavado. La resina se trató y se agitó con la mitad de la solución de cierre de DEDC durante 30 minutos, se drenó y se trató y se agitó con el segundo ½ de la solución de cierre de DEDC durante 30 minutos y se drenó. La resina se lavó seis veces con 39 l de DCM por lavado y después se secó en un horno hasta un peso constante de 3573,71 g de resina cargada con anclaje.

Referencia 50 l de síntesis en fase sólida de sustancia farmacológica bruta casimersén (PMO#1)

#### 1. Materiales

Tabla 2: Materiales de partida

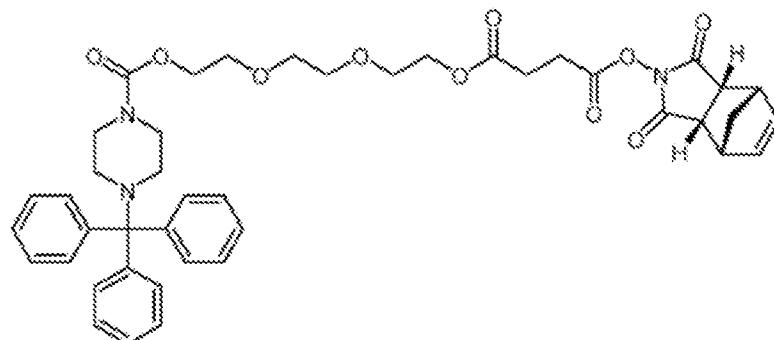
Nombre del material	Nombre químico	Número CAS	Fórmula química	Peso molecular
Subunidad A activada	Éster de N,N-dimetil-[6-[6-(benzoilamino)-9H-purin-9-il]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo, de ácido fosforamidoclorídico	1155373-30-0	C <sub>38</sub> H <sub>37</sub> CIN <sub>7</sub> O <sub>4</sub> P	722,2
Subunidad C activada	Éster de, N,N-dimetil-[6-[4-(benzoilamino)-2-oxo-1(2H)-pirimidinil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo de ácido fosforamidoclorídico	1155373-31-1	C <sub>37</sub> H <sub>37</sub> CIN <sub>5</sub> O <sub>5</sub> P	698,2

Nombre del material	Nombre químico	Número CAS	Fórmula química	Peso molecular
Subunidad DPG activada	Éster de 2,2-dimetil-,4-[[[9-[6-[[[cloro(dimetilamino)fosfinil]oxi]metil]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]-2-[(2-fenilacetil)amino]-9H-purin-6-il]oxi]metil]fenilo de ácido propanoico,	1155309-89-9	C <sub>51</sub> H <sub>53</sub> CIN <sub>7</sub> O <sub>7</sub> P	942,2
Subunidad T activada	Éster de N,N-dimetil-, [6-(3,4-dihidro-5-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil)]-4-(trifenilmetil)-2-morfolinil]metilo de ácido fosforamidoclorídico	1155373-34-4	C <sub>31</sub> H <sub>34</sub> CIN <sub>4</sub> O <sub>5</sub> P	609,1
Cola de EG3 activada	Éster de 1-[3aR,4S,7aS]-1,3,3a,4,7,7a-hexahidro-1,3-dioxo-4,7-metano-2H-isoindol-2-il]4-[2-[2-[4-(trifenilmetil)-1-piperazinil]carbonil]oxi]etoxi]etoxi]etilo de ácido butanodioico	1380600-06-5	C <sub>43</sub> H <sub>47</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub>	765,9

Estructuras químicas de los materiales de partida:

1. Una cola de EG3 activada

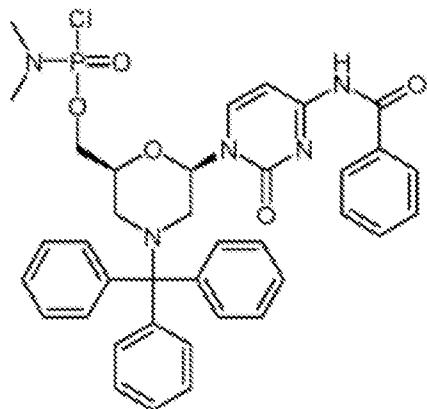
5



Compuesto (B)

2. Subunidad C activada (para su preparación véase la patente de Estados Unidos Nº 8.067.571)

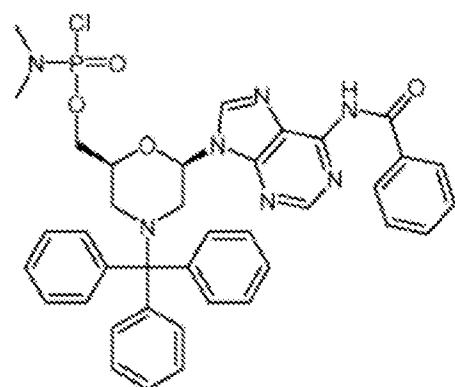
10



Compuesto de fórmula (D1)

3. Subunidad A activada (para su preparación véase la patente de Estados Unidos Nº 8.067.571)

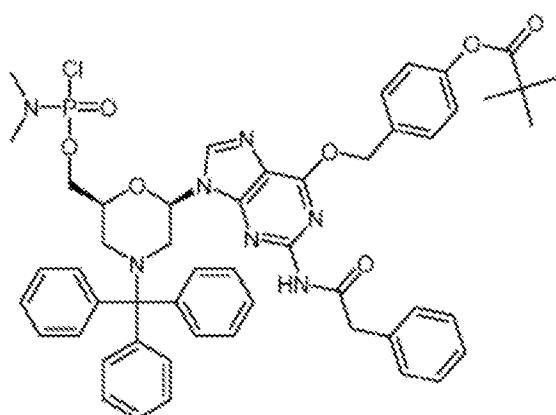
15



Compuesto de fórmula (D1)

4. Subunidad DPG activada (para su preparación véase el documento WO 2009/064471)

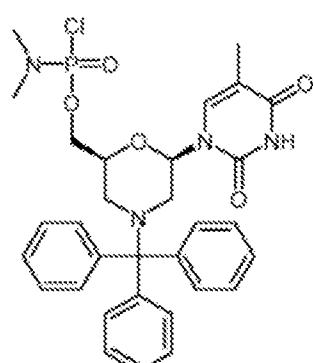
5



Compuesto de fórmula (E1)

5. Subunidad T activada (para su preparación véase el documento WO 2013/082551)

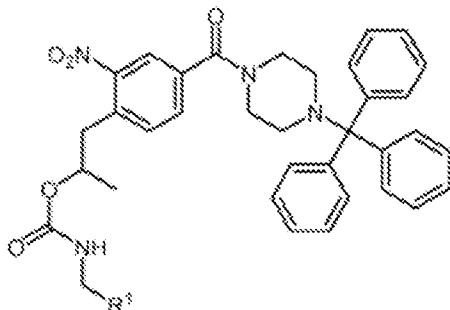
10



Compuesto de fórmula (G1)

15

6. Resina cargada con anclaje



Fórmula (I)

5 en la que R<sup>1</sup> es un medio de soporte.

Tabla 3: Descripción de las soluciones para la síntesis de oligómeros en fase sólida de la sustancia farmacológica bruta casimersén

Nombre de la solución	Composición de la solución
Solución de anclaje de NCP2	37,5 l de NMP y 1292 g de anclaje de NCP2
Solución de cierre de DEDC	4,16 l de dicarbonato de dietilo (DEDC), 3,64 l de NEM y 33,8 l de DCM
Solución de CYTFA	2,02 kg de 4-cianopiridina, 158 l de DCM, 1,42 l de TFA, 39 l de TFE y 2 l de agua purificada
Solución de neutralización	35,3 l de IPA, 7,5 l de DIPEA y 106,5 l de DCM
Solución de escisión	1.530,04 g de DTT, 6,96 l de NMP y 2,98 l de DBU

- 10 2. Síntesis de referencia de la sustancia farmacológica bruta casimersén
- A. Hinchamiento de resina
- 15 Se cargaron 750 g de resina cargada con anclaje y 10,5 l de NMP en un reactor silanizado de 50 l y se agitó durante 3 horas. Se drenó el NMP y se lavó la resina cargada con anclaje dos veces con 5,5 l cada una de DCM y dos veces con 5,5 l cada una de TFE al 30%/DCM.
- 20 B. Ciclo 0: Acoplamiento de cola de EG3
- La resina cargada con anclaje se lavó tres veces con 5,5 l cada una de TFE al 30%/DCM y se drenó, se lavó con 5,5 l de solución de CYFTA durante 15 minutos y se drenó, y se lavó nuevamente con 5,5 l de solución de CYFTA durante 15 minutos sin drenaje, a lo que se cargaron 122 ml de NEM/DCM 1:1 y la suspensión se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se lavó dos veces con 5,5 l de solución de neutralización durante 5 minutos y se drenó, después 25 dos veces con 5,5 l de DCM cada una y se drenó. Se cargó en la resina una solución de 706,2 g de cola de EG3 activada (PM 765,85) y 234 ml de NEM en 3 l de DMI, se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente y se drenó. La resina se lavó dos veces con 5,5 l de solución de neutralización durante 5 minutos por cada lavado y una vez con 5,5 l de DCM y se drenó. Se cargó una solución de 374,8 g de anhídrido benzoico y 195 ml de NEM en 2680 ml de NMP, se agitó durante 15 minutos y se drenó. La resina se agitó con 5,5 l de solución de neutralización durante 5 minutos, después se lavó una vez con 5,5 l de DCM y dos veces con 5,5 l de TFE al 30%/DCM cada una. La resina 30 se suspendió en 5,5 l de TFE/DCM al 30% y se mantuvo durante 14 horas.
- C. Ciclos de acoplamiento de subunidades 1-22
- 35 i. Tratamientos previos al acoplamiento
- Antes de cada ciclo de acoplamiento tal como se describen en la figura 17, la resina: 1) se lavó con TFE al 30%/DCM; 2) a) se trató con solución de CYFTA durante 15 minutos y se drenó, y b) se trató con solución de CYFTA durante 15 40 minutos a lo que se le añadió 1:1 NEM/DCM, se agitó y se drenó; 3) se agitó tres veces con solución de neutralización; y 4) se lavó dos veces con DCM. Véase la figura 17.
- ii. Tratamientos posteriores al acoplamiento
- Después de drenar cada solución de subunidades tal como se describe en la figura 23, la resina: 1) se lavó con DCM;

y 2) se lavó dos veces con TFE al 30%/DCM. Si la resina se mantuvo durante un periodo de tiempo antes del siguiente ciclo de acoplamiento, el segundo lavado de TFE/DCM no se drenó y la resina se retuvo en dicha solución de lavado de TFE/DCM. Véase la figura 17.

5      iii. Ciclos de acoplamiento de subunidades activadas

Los ciclos de acoplamiento se realizaron tal como se describe en la figura 17.

10     iv. Lavado final con IPA

Después de realizar la etapa de acoplamiento final tal como se describe en la figura 17, la resina se lavó 8 veces con 19,5 l de IPA cada una y se secó al vacío a temperatura ambiente durante aproximadamente 63,5 horas hasta un peso seco de 4523 g.

15     C. Escisión

La anterior sustancia farmacológica bruta casimersén unida a resina se dividió en dos lotes; cada lote se trató de la siguiente manera. Dos lotes de 2261,5 g de resina: 1) se agitaron con 10 l de NMP durante 2 h, después se drenó el NMP; 2) se lavó tres veces con 10 l de TFE al 30%/DCM cada vez; 3) se trató con 10 l de solución CYTFA durante 15 minutos; y 4) 10 l de solución CYTFA durante 15 minutos a lo que después se añadieron 130 ml de NEM/DCM 1:1 y se agitó durante 2 minutos y se drenó. La resina se trató tres veces con 10 l de solución de neutralización cada vez, se lavó seis veces con 10 l de DCM y ocho veces con 10 l de NMP cada vez. La resina se trató con una solución de escisión de 1530,4 g de DTT y 2980 de DBU en 6,96 l de NMP durante 2 horas para separar la sustancia farmacológica bruta casimersén de la resina. La solución de escisión se drenó y se retuvo en un recipiente separado. El reactor y la resina se lavaron con 4,97 l de NMP que se combinaron con la solución de escisión.

20     D. Desprotección

30     La solución de escisión y el lavado de NMP combinados se transfirieron a un recipiente de presión al que se añadieron 39,8 l de NH<sub>4</sub>OH (NH<sub>3</sub>•8H<sub>2</sub>O) que se había enfriado a una temperatura de -10 °C a -25 °C en un congelador. El recipiente a presión se selló y se calentó a 45 °C durante 16 h, después se dejó enfriar a 25 °C. Esta solución de desprotección que contenía la sustancia farmacológica bruta casimersén se diluyó 3:1 con agua purificada y el pH se ajustó a 3,0 con ácido fosfórico 2 M, después a pH 8,03 con NH<sub>4</sub>OH. HPLC: (C1880,93% y SCX-10 84,4) 73-74%.

35     Purificación de referencia de sustancia farmacológica bruta casimersén

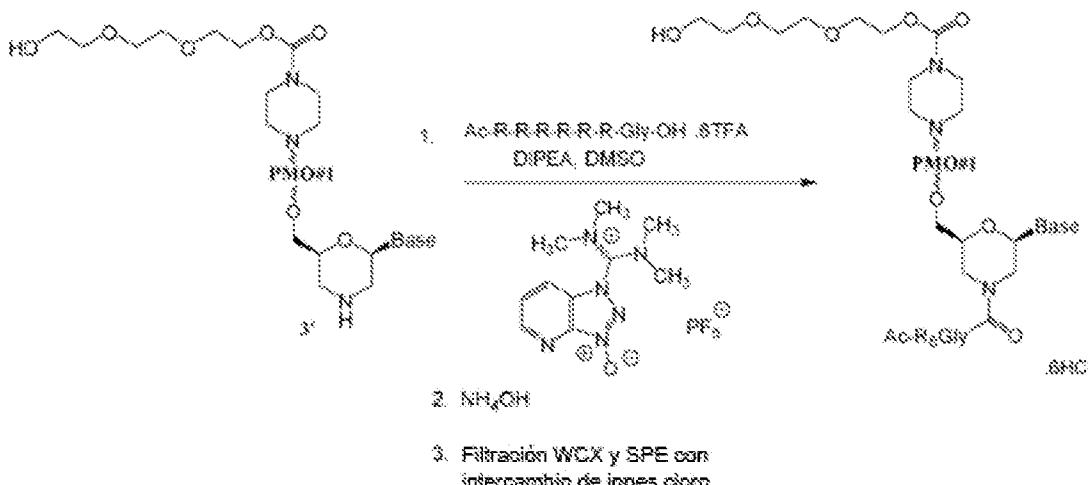
40     La parte D de la solución de desprotección anterior, que contenía la sustancia farmacológica bruta casimersén, se cargó en una columna de resina de intercambio aniónico ToyoPearl Super-Q 650S (Tosoh Bioscience) y se eluyó con un gradiente del 0-35% de B en 17 volúmenes de columna (tampón A : hidróxido de sodio 10 mM; Tampón B: cloruro de sodio 1 M en hidróxido de sodio 10 mM) y las fracciones de pureza aceptable (C18 y SCX HPLC) se agruparon en una solución de producto farmacéutico purificado. HPLC: 97,74% (C18) 94,58% (SCX).

45     La solución de sustancia farmacológica purificada se desaló y se liofilizó a 1477,82 g de sustancia farmacológica casimersén purificada. Rendimiento 63,37%; HPLC: 96,045% (C18) 96,346% (SCX).

Tabla 5. Acrónimos

Acrónimo	Nombre
DBU	1,8-Diazabiciclo[5.1.0]octano-7-eno
MCD	Diclorometano
DIPEA	N,N-Diisopropiletilamina
DMI	1,3-Dimetil-2-imidazolidinona
DTT	Ditiotreitol
IPA	Alcohol isopropílico
PM	Peso molecular
NEM	N-etilmorfolina
NMP	N-metil-2-pirrolidona
TA	Temperatura ambiente
TFA	2,2,2-Ácido trifluoroacético

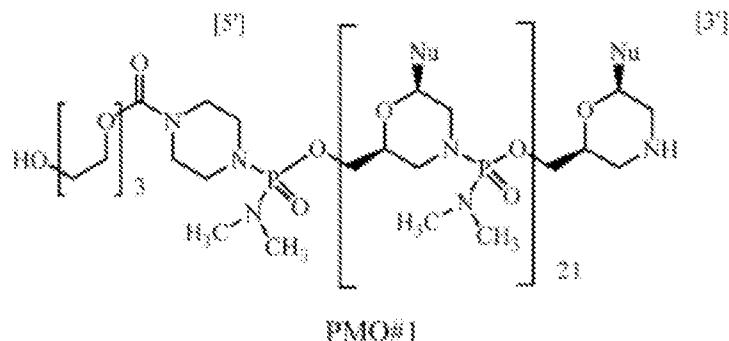
Acrónimo	Nombre
TFE	2,2,2-Trifluoroetanol

**Conjugación de CPP**

- 5 Procedimientos analíticos: Los espectros de masas con tiempo de vuelo de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) se registraron en un Bruker AutoFlexTM Speed, utilizando una matriz de ácido sinapínico (SA). La SCX-HPLC se realizó en un sistema Thermo Dionex UltiMate 3000 equipado con un detector de matriz de diodos 3000 y una columna ProPacTM SCX-20 (250 x 4 mm) con un caudal de 1,0 ml/min (pH = 2; 30 °C de temperatura de columna). Las fases móviles fueron A (25% de acetonitrilo en agua que contenía H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 24 mM) y B (25% de acetonitrilo en agua que contiene KCl 1 M y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 24 mM). Se empleó elución en gradiente: 0 min, 35% de B; 2 min, 35% de B; 22 min, 80% de B; 25 min, 80% de B; 25,1 min, 35% de B; 30 min, 35% de B.
- 10 A una mezcla de PMO#1 (1,82 g, 0,177 mmol, recién secado por liofilización durante dos días), hexafluoroacetato de Ac-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-L-Arg-Gly-OH (614,7 mg, 0,354 mmol) y hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)métile]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU, 134,4 mg, 0,354 mmol) se añadió sulfóxido de dimetilo (DMSO, 20 ml). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 minutos y después se añadió N,N-diisopropiletilamina (DIPEA, 68,5 mg, 0,530 mmol). Despues de 5 minutos, la mezcla turbia se convirtió en una solución clara. La reacción se controló mediante SCX-HPLC. Despues de 2 horas, se añadieron 20 ml de solución de hidróxido de amonio al 10% (NH<sub>3</sub> al 2,8%). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas adicionales. La reacción se terminó mediante la adición de 400 ml de agua. Se añadió trifluoroetanol (2,0 ml) a la solución.
- 15 La solución se dividió en dos porciones y cada porción se purificó utilizando una columna WCX (10 g de resina por columna). Cada columna WCX se lavó en primer lugar con acetonitrilo al 20% en agua (v/v) para eliminar el material de partida PMO#1. Los lavados (225 ml para cada columna) se detuvieron cuando el análisis de espectro de masas MALDI-TOF mostró la ausencia de señal de PMO#1. A continuación, cada columna se lavó con agua (100 ml por columna). El producto deseado, PPMO#1, se eluyó con guanidina HCl 2,0 M (140 ml para cada columna). Las soluciones purificadas de PPMO#1 se combinaron y después se dividieron en dos porciones y cada una se desaló mediante una columna SPE (10 g de resina para cada columna).
- 20 La columna de SPE se lavó en primer lugar con solución acuosa de NaCl 1,0 M (100 ml para cada columna) para generar la sal de hexaclorhidrato de PPMO#1. Despues, cada columna de SPE se lavó con agua (200 ml para cada columna). El PPMO#1 desalado final se eluyó con acetonitrilo al 50% en agua (v/v, 150 ml para cada columna). El acetonitrilo se eliminó mediante evacuación a presión reducida. La solución acuosa resultante se liofilizó para obtener el hexaclorhidrato de PPMO#1 conjugado deseado (1,93 g, 94,5% de rendimiento).
- 25
- 30
- 35

**Ejemplo de referencia 1: PMO#1**

Utilizando el protocolo del procedimiento B de síntesis de PMO descrito anteriormente, se sintetizó PMO#1:

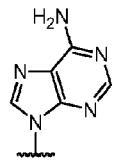


en el que cada Nu de 1 a 22 y de 5' a 3' es (SEQ ID NO: 1):

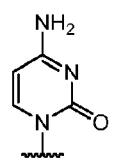
Posición Nº 5' a 3'	Nu								
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T	23	
4	T	9	T	14	G	19	C	24	
5	G	10	C	15	A	20	C	25	

5

en el que A es

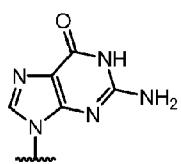


10 C es



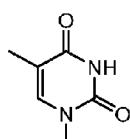
G es

15



y T es

20

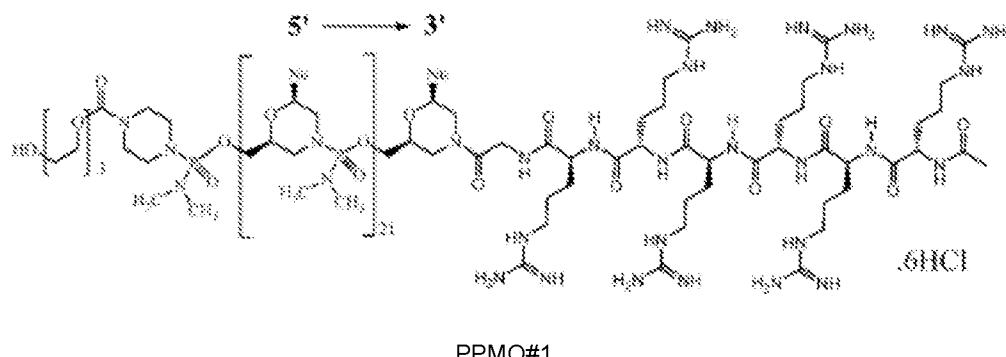


HPLC: 71,85%; Condiciones: Dionex DNAPac (DNX#97) Gradiente: 75%A + 20%B + 5%C a 0 min; 50%A a 20 min; 25%A + 75%C a 21 min; Fase móvil A: 10mM NaOH/20mM NaCl; C: 10mM NaOH/0,5 M NaCl. Temperatura de la columna: 45C; Velocidad de flujo 1.0 mL/min.

25

## Ejemplo 2: PPMO#1

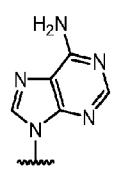
Utilizando el protocolo descrito anteriormente, puede sintetizarse PPMO#1 a partir de PMO#1:



en el que cada Nu de 1 a 22 y de 5' a 3' es (SEQ ID NO:1):

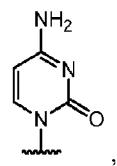
Posición Nº 5' a 3'	Nu								
1	C	6	C	11	C	16	G	21	T
2	A	7	C	12	T	17	T	22	G
3	A	8	A	13	G	18	T	23	
4	T	9	T	14	G	19	C	24	
5	G	10	C	15	A	20	C	25	

en el que A es

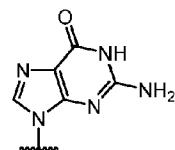


15

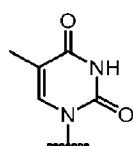
Ces



20 Ges



y T es



**Ejemplo 3:** Omisión del exón 45 *in vitro*

Se evaluó la capacidad para inducir la omisión del exón 45 de dos compuestos dirigidos al exón 45 de la distrofina humana, tal como se describe en la tabla siguiente, PMO#1 y PPMO#1, ambos ensamblados en la misma secuencia.

Nombre	Secuencia de direccionamiento (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCCTG	1	EG3	H
PPMO# 1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCCTG	1	EG3	-G-R <sub>6</sub>

Especificamente, se utilizaron miocitos humanos diferenciados para determinar la capacidad de los compuestos anteriores para inducir la omisión del exón 45 a diferentes concentraciones (es decir, 40 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2,5 µm y 1,25 µm). Después de la diferenciación, las células se incuban con los compuestos durante noventa y seis horas seguidas de aislamiento de ARN y se midió la omisión del exón 45 mediante RT-PCR tal como se ha descrito anteriormente.

**Ejemplo de referencia 4:** Estudio en ratones MDX

El ratón MDX es un modelo animal aceptado y bien caracterizado para la distrofia muscular de Duchenne (DMD) que contiene una mutación en el exón 23 del gen de la distrofina. Se sabe que la secuencia antisentido M23D (SEQ ID NO: 2) induce la omisión del exón 23 y restaura la expresión funcional de distrofina. A los ratones MDX de 6-7 semanas de edad se les administró una única inyección en la vena de la cola de PPMO4225 o PMO4225 de la tabla siguiente a una dosis de 40 mg/kg, o solución salina.

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

PMO4225 y PPMO4225 se prepararon cada uno mediante el procedimiento A de PMO y los procedimientos de conjugación CPP descritos anteriormente.

Los ratones tratados se sacrificaron a los 7, 30, 60 y 90 días después de la inyección de dosis única (n=6 por grupo). El diafragma, el corazón y el cuádriceps derecho se procesaron para análisis de inmunotransferencia Western a fin de medir la producción de proteína distrofina y para análisis de RT-PCR a fin de medir el porcentaje de omisión de exón, y el cuádriceps izquierdo se procesó para inmunohistoquímica y tinción H/E tal como se ha descrito anteriormente.

La restauración de la proteína distrofina se cuantificó mediante inmunotransferencia Western, y el porcentaje de omisión del exón 23 se midió mediante RT-PCR, cada uno tal como se ha descrito anteriormente con un cebador directo SEQ ID NO: 5 (5'-CACATCTTGATGGTGAGG-3') y un cebador inverso SEQ ID NO: 6 (5'-CAACTTCAGCCATCCATTCTG -3').

Los resultados de la RT-PCR se muestran en las figuras 4A-9B y en las tablas siguientes. Sorprendentemente, PPMO4225 indujo niveles significativamente más altos y mantenidos de restauración de distrofina y omisión del exón 23 que PMO4225, produciéndose los niveles más altos 30 días después de la inyección. De forma aún más sorprendente, PPMO4225 aumentó los niveles de distrofina en el corazón cuando PMO4225 no lo hizo; no se observaron distrofina ni omisión de exón en el corazón en ninguno de los puntos temporales con PMO4225.

Tejido	Cuantificación de proteína distrofina como porcentaje de proteína de tipo silvestre (%WT) mediante inmunotransferencia Western								
	Compuesto	PMO4225				PPMO4225			
		Día	7	30	60	90	7	30	60
Cuádriceps			1,1	2,3	1,6	0,7	20,7	28,1	20,8
Diafragma			1,4	1,9	1,3	0,6	14,5	15,2	9,8
Corazón			0	0	0	0	2,0	1,0	0,9
Porcentaje de omisión de exón medida por RT-PCR									
Compuesto	PMO4225				PPMO4225				
	Día	7	30	60	90	7	30	60	90

	Cuantificación de proteína distrofina como porcentaje de proteína de tipo silvestre (%WT) mediante inmunotransferencia Western									
	Compuesto		PMO4225				PPMO4225			
	Día		7	30	60	90	7	30	60	90
<u>Tejido</u>										
<u>Tejido</u>										
Cuádriceps			21,2	5,5	7,9	2,8	61,5	42,02	28,8	6,9
Diafragma			29,9	2,6	0,5	0	51,6	36,76	3,05	0
Corazón			0	0	0	0	13,15	2,64	0	0

Los resultados de la inmunohistoquímica se muestran en la figura 10. A este respecto, PPMO4225 restaura la distrofina en todo el cuádriceps, mientras que 4225 produce un patrón de expresión ' parcheado'. La distribución uniforme de la distrofina con el tratamiento con PPMO4225 indica que se puede lograr un direccionamiento generalizado al músculo esquelético. PPMO4225 ha mejorado significativamente el suministro con respecto a PMO4225 *in vivo*.

5

#### Ejemplo 5: Omisión del exón 45 en NHP

A monos cynomolgus se les inyectó por vía intravenosa PPMO#1, PMO#1, o solución salina según el programa de dosificación de la tabla siguiente:

10 Programa de dosificación de Cynomolgus

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Número por grupo	Estrategia de administración	
1	PPMO#1	20	3		Una vez a la semana, 4 dosis. Los animales se sacrifican 48 horas después de la última dosis, el día 22
2	PPMO#1	40	3		
3	PPMO#1	80	3		
4	PPMO#1	160	3		
5	PMO#1	40	3		
6	Solución salina	0	2		
7	PPMO#1	40	2		30 días Dosis única el día 1 con recuperación de 4 semanas
8	PPMO#1	40	2		60 días Dosis única el día 1 con recuperación de 8 semanas

15

Los animales serán observados durante todo el estudio, incluyendo observaciones clínicas (por ejemplo, evaluación de la piel y el pelaje, efectos respiratorios) y mediciones del peso corporal. Se tomarán muestras de sangre y orina al menos antes de que comiencen las pruebas y 24 horas después de la primera dosis y la última dosis (si es el caso).

20

En cada necropsia programada, o eutanasia *in extremis*, se recogieron y se congelaron inmediatamente secciones de los bíceps, deltoides, diafragma, riñón, músculo liso del esófago, duodeno, cuádriceps, aorta, cerebro (lóbulo frontal izquierdo) corazón y ano. Además, las secciones de los cuádriceps, deltoides, diafragma y corazón se incrustarán en OCT y congelado en hielo seco.

El porcentaje de omisión del exón 45 se determinó usando RT-PCR tal como se ha descrito anteriormente. Los resultados se muestran en las figuras 12-15 y en la tabla siguiente.

**Ejemplo de referencia 6:** Estudio de respuesta a la dosis en ratones MDX

- 5 Ratones MDX de 6-7 semanas de edad a los que se les administró una única inyección en la vena de la cola de un PPMO4225 o PMO4225 descrito anteriormente a una dosis de 40 mg/kg, 80 mg/kg o 120 mg/kg (n=6 por grupo).
- 10 Los ratones tratados se sacrificaron 30 días después de la inyección. El diafragma, el cuádriceps y el corazón se procesaron para análisis de inmunotransferencia Western a fin de medir la producción de proteína distrofina basándose en el protocolo de inmunotransferencia Western descrito anteriormente (utilizado, por ejemplo, en el ejemplo 4) con las modificaciones siguientes:

Parámetro	Protocolo de inmunotransferencia Western del ejemplo 4	Modificaciones del protocolo de inmunotransferencia Western
Cuantificación de proteínas	Kit de ensayo de proteínas RC DC	Procedimiento BCA
Etapa de bloqueo	Durante la noche a 4°C	1 hora en TA
Incubación de anticuerpos primarios	1 hora a TA	Durante la noche a 4°C
Concentración de anticuerpos primarios	1:20	1:500

- 15 La restauración de la proteína distrofina como % de tipo silvestre se presenta en la tabla siguiente y en las figuras 11-14.

Compuesto	Cuantificación de la proteína distrofina como porcentaje de proteína de tipo silvestre (%WT) por inmunotransferencia Western						
	PMO4225			PPMO4225			
	Dosis (mg/kg)	40	80	120	40	80	120
<u>Tejido</u>							
Diafragma	0,80	0,97	1,83	8,02	26,03	42,77	
Corazón	0,13	0,24	0,34	0,61	6,34	19,48	
Cuádriceps	3,5	2,6	3,0	43	90	144	

- 20 Sorprendentemente, los datos muestran que una sola dosis de PPMO4225 aumenta los niveles de distrofina de forma dependiente de la dosis en ratones mdx de manera significativa y sustancialmente superior a PMO4225.

**Ejemplo de referencia 7:** Estudio de IHC en ratón MDX de diafragma y corazón

- 25 A ratones MDX de 6-7 semanas de edad se les administró una única inyección en la vena de la cola de PPMO4225 a una dosis de 80 mg/kg o solución salina, y a los ratones de tipo silvestre de 6-7 semanas de edad se les administró una única inyección de solución salina. Los ratones mdx tratados, los ratones mdx con solución salina y los ratones de tipo silvestre se sacrificaron 30 días después de la inyección de dosis única (n=4 por grupo). Los resultados de la inmunohistoquímica se muestran en la figura 18. A este respecto, los resultados muestran un aumento uniforme de la distrofina en los tejidos asociados con la morbilidad y la mortalidad en DMD en ratones Mdx tratados con PPMO4225.

30 **Ejemplo 8:** Omisión del exón 45 *in vitro* (mioblastos)

- 35 Dos compuestos dirigidos al exón 45 de la distrofina humana (DMD) tal como se describe en la tabla siguiente, PMO#1 y PPMO#1 que contienen la misma secuencia, se evaluaron para determinar la omisión del exón 45 de DMD en mioblastos humanos sanos.

Secuencias de PMO#1 y PPMO#1 para exón 45 de DMD humana.

Nombre	Secuencia de direccionamiento (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCCTG	1	EG3	H
PPMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCCCTG	1	EG3	-G-R <sub>6</sub>

- 40 Específicamente, se plaquearon mioblastos humanos sanos (pasaje 5-6, SKB-F-SL adquiridos de Zen-Bio, Inc.) con

una confluencia de ~40% cuando se trataron con PMO#1 o PPMO#1 a varias concentraciones (es decir, 40 µm , 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2,5 µm y 1,25 µm) en medios SKM-M (Zen-Bio, Inc.). Después de noventa y seis horas de incubación, los mioblastos se lavaron con PBS y se lisaron con tampón de lisis RA1 en el kit Illustra GE RNAspin 96 (Cat#25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). El ARN total se aisló según las recomendaciones del fabricante, excepto que se usaron 40 µl de agua exenta de RNasa para eluir el ARN.

Para determinar la omisión del exón 45 por parte de ambos compuestos, se realizó una RT-PCR de punto final en dos etapas. Específicamente, once microlitros de ARN total se transcribieron en primer lugar de forma inversa a ADNc mediante el kit de síntesis de primera cadena SuperScript IV (Nº de cat. 18091200, Invitrogen) utilizando hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó añadiendo 9 µl de ADNc en Platinum Taq DNA polymerase PCR Supermix High Fidelity (Nº de cat. 12532024, Invitrogen) con cebadores dirigidos a exones 43 y 46 de DMD humana [cebador directo (SEQ ID NO: 7): CTACAGGAAGCTCTCCAG; cebador inverso (SEQ ID NO: 8): GTTATCTGCTTCCTCCAACCA]. La amplificación por PCR se realizó utilizando un termociclador en tiempo real BioRad CFX96 utilizando el programa que se muestra en la tabla siguiente. La expresión de los productos de PCR omitidos o no omitidos se evaluó cargando 32 µl de producto de PCR en el sistema LabChip GX utilizando el kit de reactivos de alta sensibilidad de ADN (CLS760672, Perkin Elmer). El porcentaje de omisión del exón 45 de DMD se calculó como el porcentaje de la molaridad (nmol/l) para la banda omitida del exón 45 (301 pb) en comparación con la suma de la molaridad para las bandas omitidas (301 pb) y no omitidas (477 pb).

Se utilizó la prueba t de Student no pareada de dos colas (homocedástica) para evaluar si las medias de los 2 grupos son estadísticamente diferentes entre sí en cada dosis. El valor de p < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Programa termociclador utilizado para amplificar amplicones de *DMD* con o sin omisión del exón 45.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización	94 °C	2 min
2. Desnaturalización	94 °C	30 s
3. Hibridación	59,3 °C	30 s
4. Extensión	68 °C	1 min
5. Repetición de la etapa 2-4	34 ciclos	
6. Extensión final	68 °C	5 min
7. Almacenamiento	4 °C	∞

Los resultados, que muestran que PPMO#1 aumenta significativamente la omisión del exón 45 en comparación con PMO#1 en mioblastos humanos, se proporcionan en la siguiente tabla y en la figura 19.

Porcentaje de omisión del exón 45 de *DMD* por PMO#1 y PPMO#1 en mioblastos humanos.

Compuesto/Dosis (µm)	Porcentaje de omisión de exón (media ± SD)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
PMO#1	0,00 ± 0,00	1,00 ± 0,90	1,40 ± 1,22	3,39 ± 1,13	6,83 ± 1,06	11,98 ± 1,58
PPMO#1	2,64 ± 0,41	4,69 ± 0,77	8,43 ± 0,81	14,00 ± 2,93	24,71 ± 3,41	40,46 ± 4,44

#### Ejemplo 9: Omisión del exón 45 *in vitro* (miotubos)

Se evaluaron dos compuestos dirigidos al exón 45 de la distrofina humana (*DMD*) tal y como se describe en la siguiente tabla, PMO#1 y PPMO#1, que contienen la misma secuencia, para determinar la omisión del exón 45 de DMD en miotubos humanos sanos.

Secuencias de PMO#1 y PPMO#1 para el exón 45 de la DMD humana.

Nombre	Secuencia de direccionamiento (TS)	TS SEQ ID NO.	5'	3'
PMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCTG	1	EG3	H
PPMO#1	CAATGCCATCCTGGAGTTCTG	1	EG3	-G-R <sub>6</sub>

Específicamente, se cultivaron mioblastos humanos sanos (pasaje 5-6, SKB-F-SL adquiridos de Zen-Bio, Inc.) para alcanzar una confluencia del 80-90% en medios SKM-M antes del inicio de la diferenciación mediante incubación en medios con poca concentración de suero (SKM-D, Zen-Bio, Inc.). Cinco días después de la diferenciación, se

incubaron miotubos maduros con los compuestos anteriores diversas concentraciones (es decir, 40 µm, 20 µm, 10 µm, 5 µm, 2,5 µm y 1,25 µm). Después de noventa y seis horas de incubación, los miotubos se lavaron con PBS y se lisaron con tampón de lisis RA1 en el kit Illustra GE RNAspin 96 (Nº de cat. 25-055-75, GE Healthcare Bio-Sciences). El ARN total se aisló según las recomendaciones del fabricante, excepto que se usaron 40 µl de agua exenta de RNasa para eluir el ARN.

Para determinar la omisión del exón 45 de DMD por parte de ambos compuestos, se realizó una RT-PCR de punto final de dos etapas. Específicamente, once microlitros de ARN total se transcribieron en primer lugar de forma inversa a ADNc mediante el kit de síntesis de primera cadena SuperScript IV (Nº de cat. 18091200, Invitrogen) utilizando hexámeros aleatorios según las instrucciones del fabricante. La PCR se realizó añadiendo 9 µl de ADNc en Platinum Taq DNA polymerase PCR Supermix High Fidelity (Nº de cat. 12532024, Invitrogen) con cebadores dirigidos a exones 43 y 46 de DMD humana [cebador directo (SEQ ID NO: 7): CTACAGGAAGCTCTCCAG; cebador inverso (SEQ ID NO: 8): GTTATCTGCTTCCTCCAACCA]. La amplificación por PCR se realizó utilizando un termociclador en tiempo real BioRad CFX96 utilizando el programa que se muestra en la tabla siguiente. La expresión de los productos de PCR omitidos o no omitidos se evaluó cargando 32 µl de producto de PCR en el sistema LabChip GX usando el kit de reactivos de alta sensibilidad de ADN (CLS760672, Perkin Elmer). El porcentaje de omisión del exón 45 de DMD se calculó como el porcentaje de la molaridad (nmol/l) para la banda omitida del exón 45 (301 pb) en comparación con la suma de la molaridad para las bandas omitidas (301 pb) y no omitidas (477 pb).

Se utilizó la prueba t de Student no pareada de dos colas (homocedástica) para evaluar si las medias de los 2 grupos son estadísticamente diferentes entre sí en cada dosis. El valor de p < 0,05 se consideró estadísticamente significativo.

Programa termociclador utilizado para amplificar amplicones de *DMD* con o sin omisión del exón 45.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1. Desnaturalización	94 °C	2 min
2. Desnaturalización	94 °C	30 s
3. Hibridación	59,3 °C	30 s
4. Extensión	68 °C	1 min
5. Repetición de la etapa 2-4	34 ciclos	
6. Extensión final	68 °C	5 min
7. Almacenamiento	4 °C	∞

Los resultados, que muestran que PPMO#1 aumenta significativamente la omisión del exón 45 de DMD en comparación con PMO#1, se presentan en la tabla siguiente y en la figura 20.

Porcentaje de omisión del exón 45 de *DMD* por PMO#1 y PPMO#1 en miotubos humanos.

Compuesto/Dosis (µm)	Porcentaje de omisión de exón (media ± SD)					
	1,25	2,5	5	10	20	40
PMO#1	0,90 ± 0,57	1,08 ± 0,30	1,69 ± 0,53	3,10 ± 0,77	4,64 ± 3,10	10,02 ± 6,83
PPMO#1	4,54 ± 1,06	12,79 ± 3,23	25,65 ± 8,42	37,18 ± 5,74	58,29 ± 17,16	73,51 ± 3,82

#### Referencias

- Aartsma-Rus, A., A. A. Janson, et al. (2004). "Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense". Am J Hum Genet 74(1): 83-92.
- Abes, R., et al. (2008). "Arginine-rich cell penetrating peptides: design, structure-activity, and applications to alter pre-mRNA splicing by steric-block oligonucleotides". J Pept. Sci. 14: 455-460.
- Alter, J., et al. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology". Nat. Med. 12(2): 175-177.
- Bestas, B., et al. (2014). "Splice-correcting ligonucleotides restore BTK function in X-linked agammaglobulinemia model". J. Clin. Invest.
- Cirak, S., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study". Lancet 378(9791): 595-605.

- Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides". *Nucleosides & Nucleotides* 16(7-9): 1665-1668.
- 5 Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides". *Hum Mol Genet* 7(7): 1083-90.
- Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene". *J Gene Med* 5(6): 518-27.
- 10 Goemans, N. M., M. Tulinius, et al. (2011). "Systemic Administration of PR0051 in Duchenne's Muscular Dystrophy". *N Engl J Med*.
- 15 Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice". *Mol Ther*.
- Jearawiriyapaisarn, N., et al. (2010). "Long-term improvement in mdx cardiomyopathy after therapy with peptide-conjugated morpholino oligomers". *Cardiovascular Research* 85: 444-453.
- 20 Kinali, M., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2009). "Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study". *Lancet Neurol* 8(10): 918-28.
- 25 Leblue, B., et al. (2008). "Cell penetrating peptide conjugates of steric block oligonucleotides". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60: 517-529.
- Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse". *Nat Med* 9(8): 1009-14.
- 30 Mann, C. J., K. Honeyman, et al. (2002). "Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy". *J Gene Med* 4(6): 644-54.
- Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing". *Journal of Immunological Methods* 325(1-2): 114-126.
- 35 Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe". *J Clin Invest* 87(6): 2127-31.
- McClory, G., et al. (2006). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restored dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD". *Gene Therapy* 13: 1373-1381.
- 40 Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus". *Genomics* 2(1): 90-5.
- 45 Moulton, H.M., (2007). "Cell-penetrating peptide-morpholino conjugates alter pre-mRNA splicing of DMD (Duchenne muscular dystrophy) and inhibit murine coronavirus replication in vivo". *Biochem. Society Trans* 35(4): 826-828.
- Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence". *Biochem Biophys Res Commun* 226(2): 445-9.
- 50 Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina
- Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides". *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(23): 12840-4.
- 55 Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties". *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 7(3): 187-95.
- 60 Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe". *J Clin Invest* 95(2): 515-20.
- van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells". *Hum Mol Genet* 10(15): 1547-54.
- 65 van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051".

N Engl J Med 357(26): 2677-86.

Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript". Mol Ther 15(7): 1288-96.

5 Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides". Neuromuscul Disord 9(5): 330-8.

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

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

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

20 Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function". Hum Mol Genet 17(24): 3909-18.

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

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

#### LISTADO DE SECUENCIAS

Descripción	Secuencia 5' a 3' o N-terminal a C-terminal	SEQ ID NO
H51A(+03+19)	CAATGCCATCCTGGAGTTCCCTG	1
Mdx4225	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	2
R <sub>6</sub>	RRRRRR	3
R <sub>6</sub> -G	RRRRRRRG	4
Cebador directo de unión al exón 23 de ratón	CCAGCCACTCAGCCAGTGAAG	5
Cebador inverso de unión al exón 23 de ratón	CGATCCGTAATGATTGTTCTAGCC	6
Cebador directo de unión al exón 45 humano	CACATCTTGATGGTGTGAGG	7
Cebador inverso de unión al exón 45 humano	CAACTTCAGCCATCCATTCTG	8

#### 30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SAREPTA THERAPEUTICS, INC.

<120> CONJUGADOS DE OLIGÓMERO DE OMISIÓN DE EXONES PARA DISTROFIA MUSCULAR

35 <130> P117900EP

<140> EP 17832401.8

<141> 13/12/2017

40 <150> US 62/436.182  
<151> 19/12/2016

<150> US 62/443.476

<151> 06/01/2017

<150> US 62/479.173

<151> 30/03/2017

45 <150> US 62/562.080

<151> 22/09/2017

<160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

5    <210> 1  
   <211> 30  
   <212> ADN  
   <213> Secuencia Artificial

10   <220>  
     <223> Sintético: H51A(+66+95)

15   <400> 1  
   ctccaaacatc aaggaagatg gcatttctag 30  
   <210> 2  
   <211> 25  
   <212> ADN  
   <213> Secuencia Artificial

20   <220>  
     <223> Sintético: mdx4225

25   <400> 2  
   ggccaaacct cggcttacct gaaat 25  
   <210> 3  
   <211> 6  
   <212> PRT  
   <213> Secuencia Artificial

30   <220>  
     <223> Sintético: R6

35   <400> 3  
   **Arg Arg Arg Arg Arg Arg**  
   1                        5

40   <210> 4  
   <211> 7  
   <212> PRT  
   <213> Secuencia Artificial

45   <220>  
     <223> Sintético: R6-G

50   <400> 4  
   **Arg Arg Arg Arg Arg Arg Gly**  
   1                        5

55   <210> 5  
   <211> 21  
   <212> ADN  
   <213> Secuencia Artificial

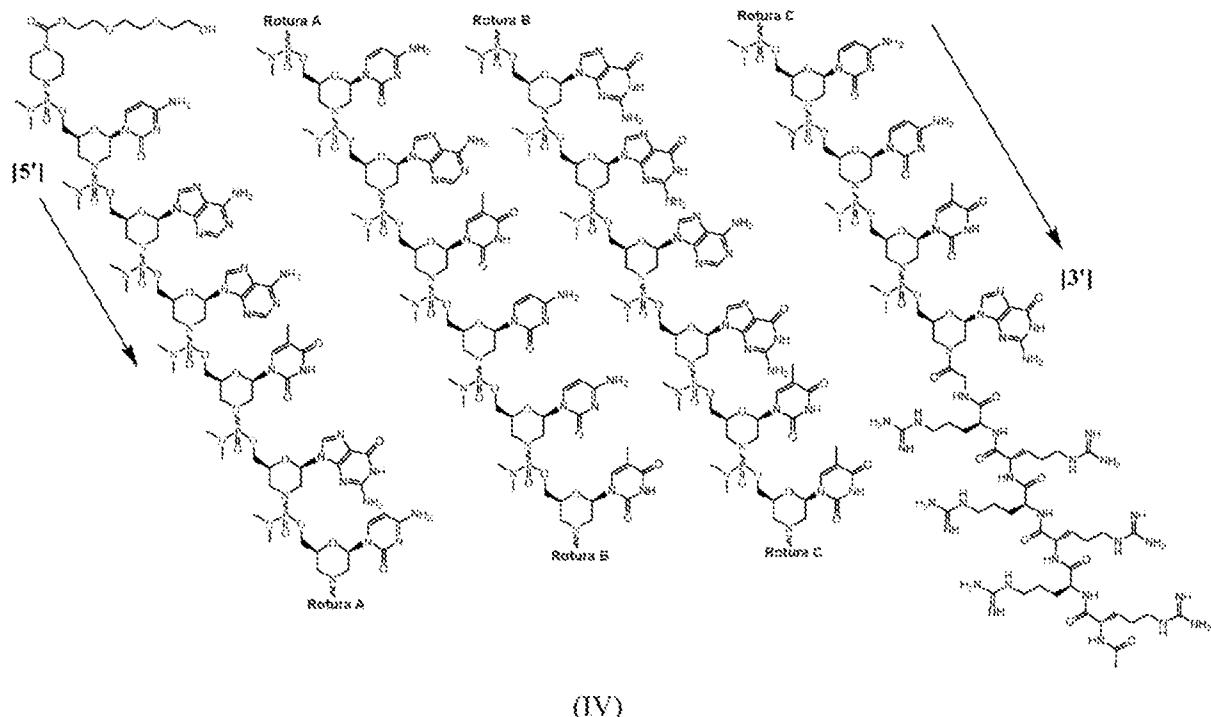
60   <220>  
     <223> Sintético: cebador directo de unión al exón 49 humano

65   <400> 5  
   ccagccactc agccagtcaa g 21  
   <210> 6  
   <211> 24  
   <212> ADN

<213> Secuencia Artificial  
5           <220>  
          <223> Sintético: cebador inverso de unión al exón 52 humano  
          <400> 6  
          cgatccgtaa tgattgtct agcc 24  
10          <210> 7  
          <211> 21  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
15          <220>  
          <223> Sintético: cebador directo de unión al exón 23 de ratón  
          <400> 7  
          cacatcttg atggtgtgag g 21  
20          <210> 8  
          <211> 22  
          <212> ADN  
          <213> Secuencia Artificial  
25          <220>  
          <223> Sintético: cebador inverso de unión al exón 23 de ratón  
          <400> 8  
          caacttcagc catccatttc tg 22  
30

## REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de oligómero antisentido de fórmula (IV):



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en un sujeto primate que lo necesite, en  
10 donde el sujeto primate tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

2. Un conjugado de oligómero antisentido de Fórmula (IV), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un procedimiento para la restauración de un marco de lectura de ARNm para inducir la producción de distrofina en un sujeto primate que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

15 3. El conjugado de oligómero antisentido, la sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el uso comprende administrar al sujeto primate una composición farmacéutica que comprende el conjugado de oligómero antisentido de Fórmula (IV) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 4. Una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un conjugado de oligómero antisentido de Fórmula (IV), como se define en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la exclusión del exón 45 del pre-ARNm de distrofina durante el procesamiento del ARNm en un sujeto primate que tiene una mutación en el gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

25 5. Una composición farmacéutica que comprende un conjugado de un oligómero antisentido de Fórmula (IV), como se define en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para su uso en la unión del exón 45 del pre-ARNm de la distrofina en un sujeto primate que tiene una mutación del gen de la distrofina que es susceptible a la omisión del exón 45.

30 6. El conjugado de un oligómero antisentido, la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el sujeto es un humano.

35 7. El conjugado de un oligómero antisentido, la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en donde el conjugado de un oligómero antisentido es una forma de una sal farmacéuticamente aceptable.

40 8. El conjugado de un oligómero antisentido, la sal farmacéuticamente aceptable del mismo o la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el conjugado de un oligómero antisentido es

una forma de una sal farmacéuticamente aceptable de la Fórmula (IVA):

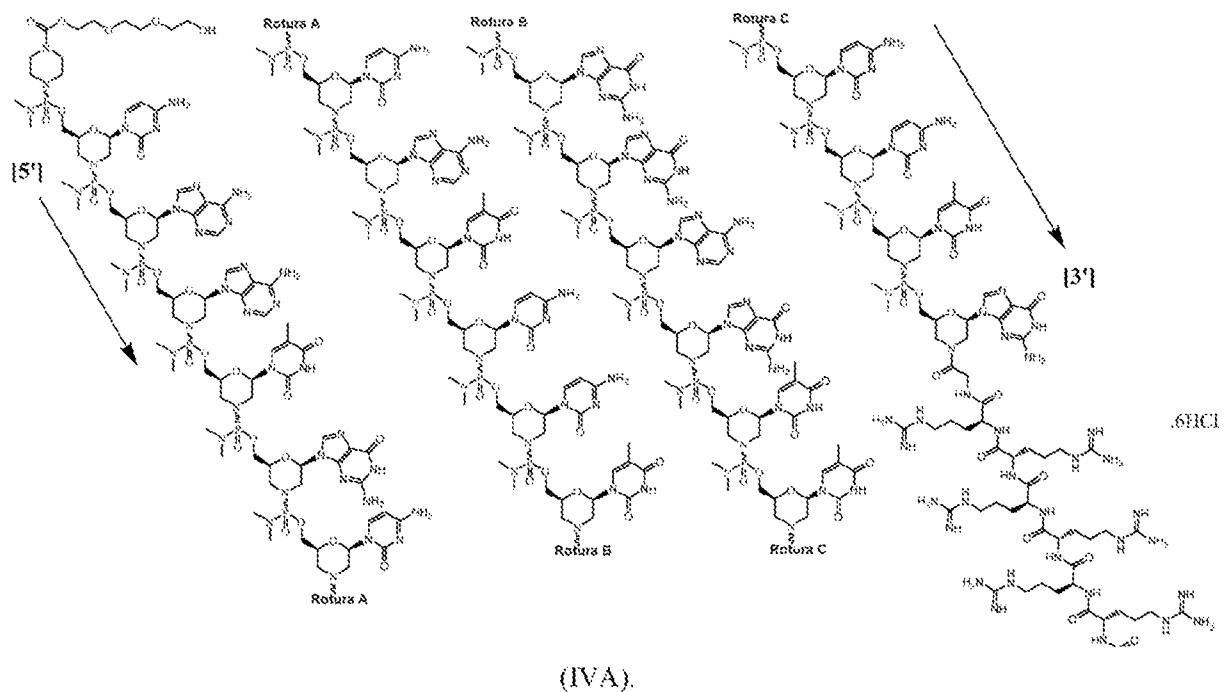


Figura 1

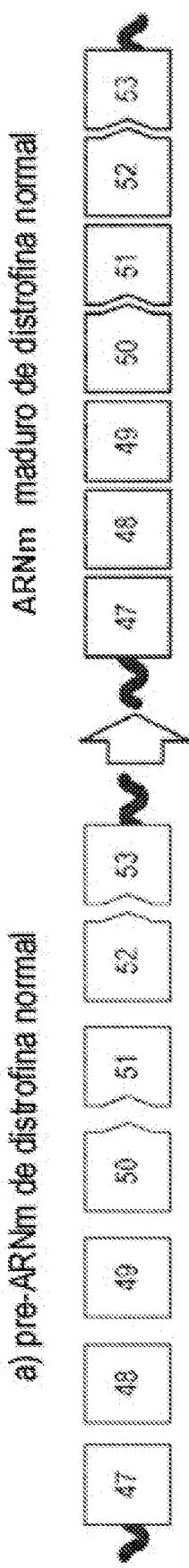


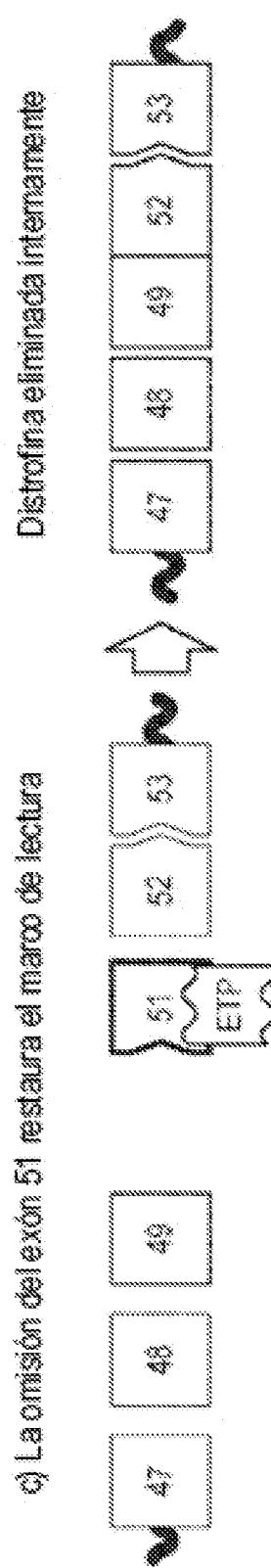
Figura 2

Distro fina inestable no funcional

b) La eliminación del exón 50 altera el marco de lectura



Figura 3



Q) La omisión del letrón 51 restaura el marco de lectura

Fuente: adaptado de Kole 2012

Figura 4A

7 días

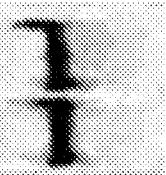
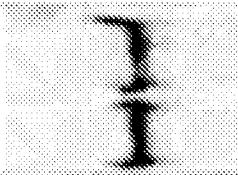
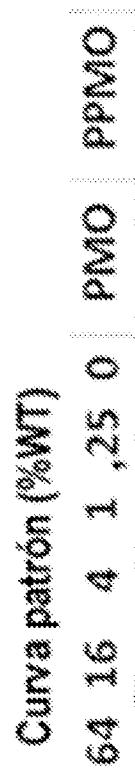


Figura 4B

30 días

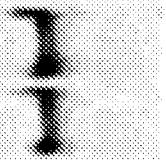
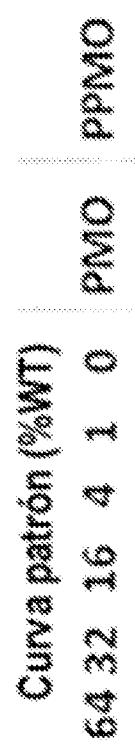


Figura 4C

60 días                    90 días

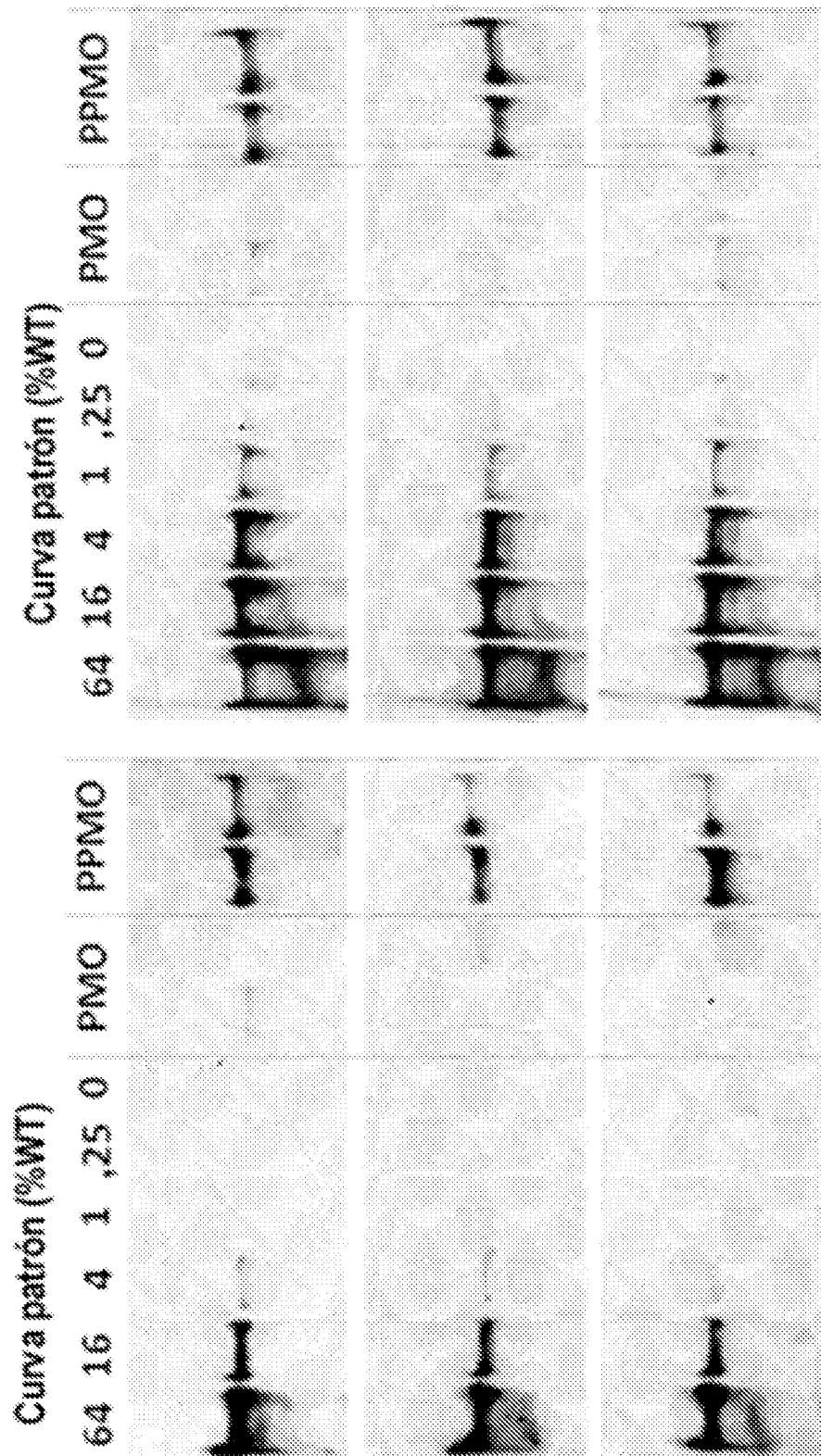


Figura 4D

Figura 5A

## Immunotransferencias Western

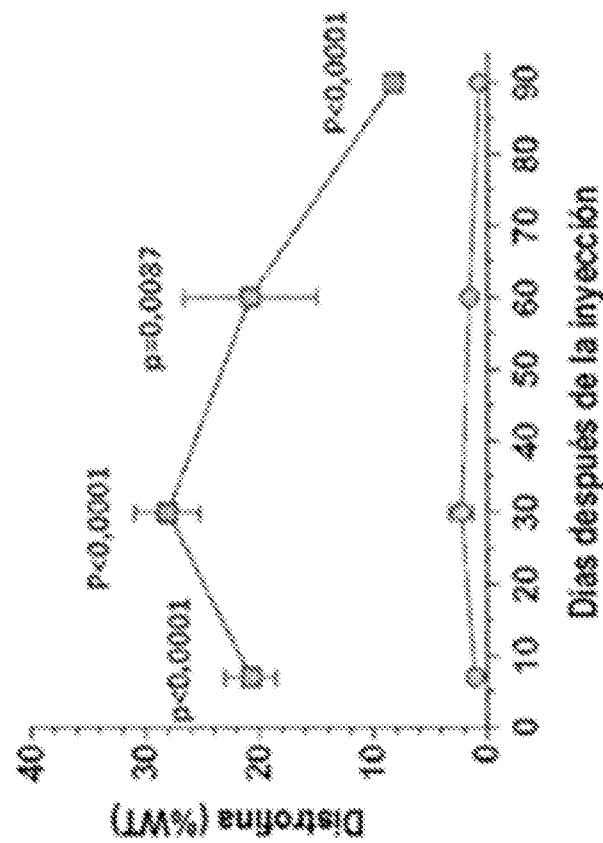


Figura 5B

## RT-PCR

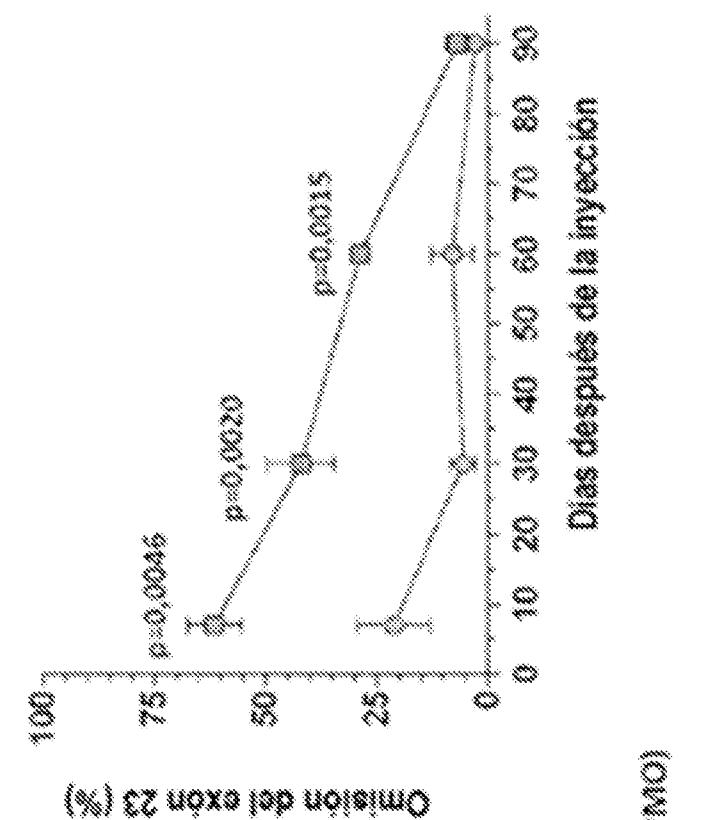


Figura 6A

7 días

Curva patrón (%WT)

32 16 4 1 0 PMO ppmMO

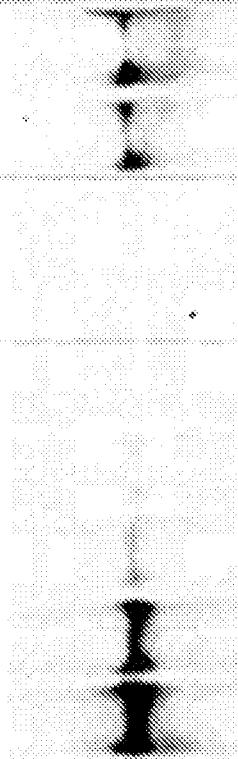
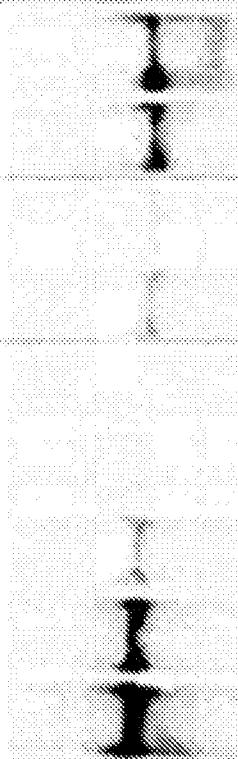


Figura 6B

30 días

Curva patrón (%WT)

32 16 4 1 0 PMO ppmMO

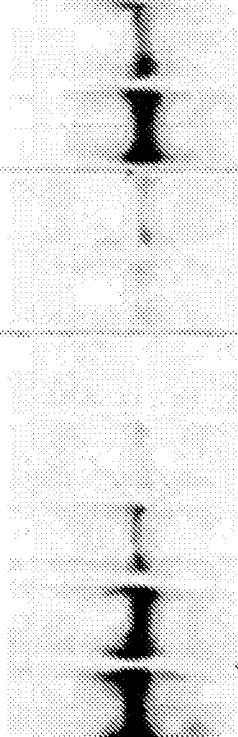
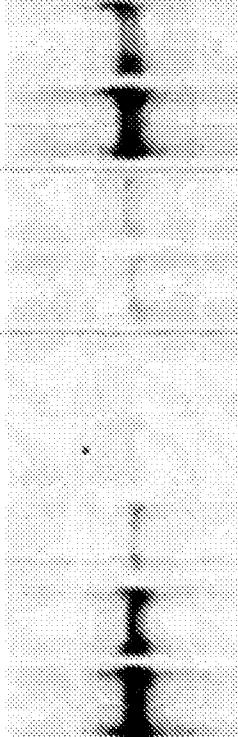
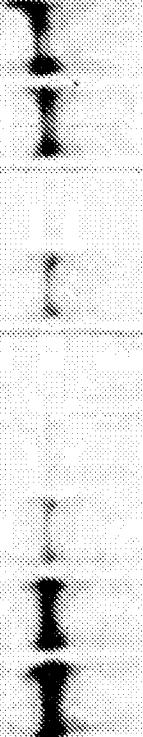


Figura 6C

60 días

Curva patrón (%WT)

32 16 4 1 0 ppmO ppmO

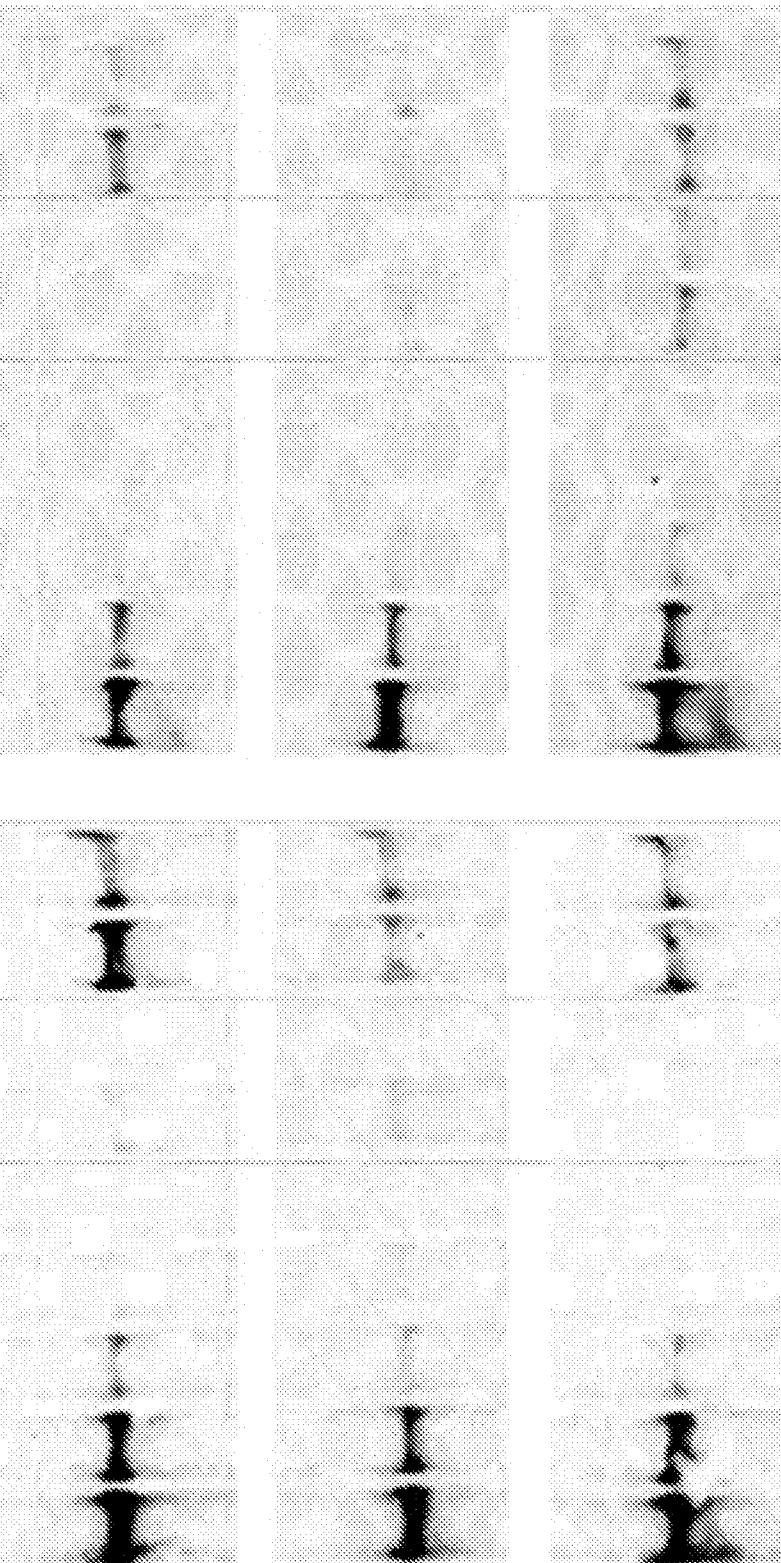


Figura 6D

90 días

Curva patrón (%WT)

16 4 1 ,25 0 ppmO ppmO

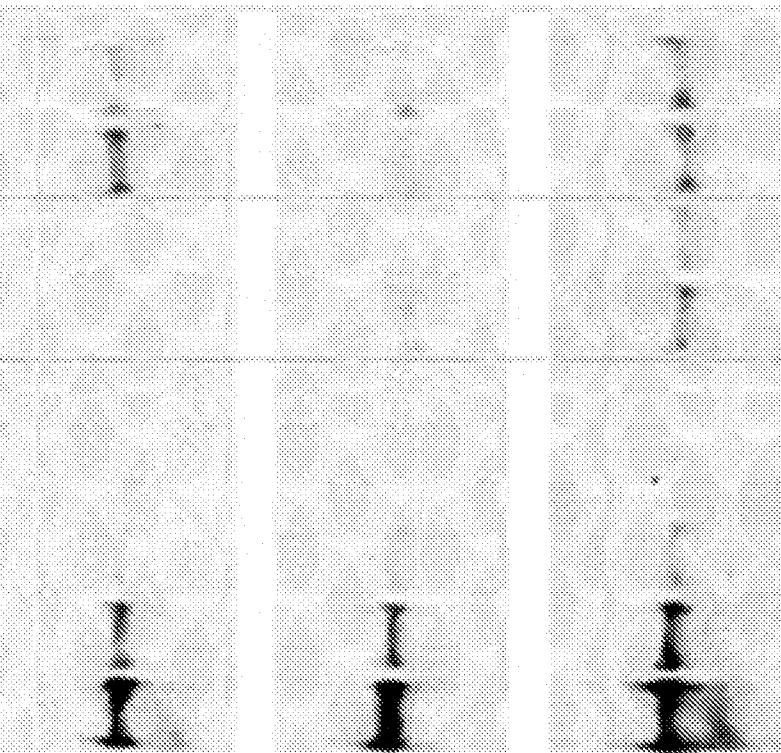


Figura 7A

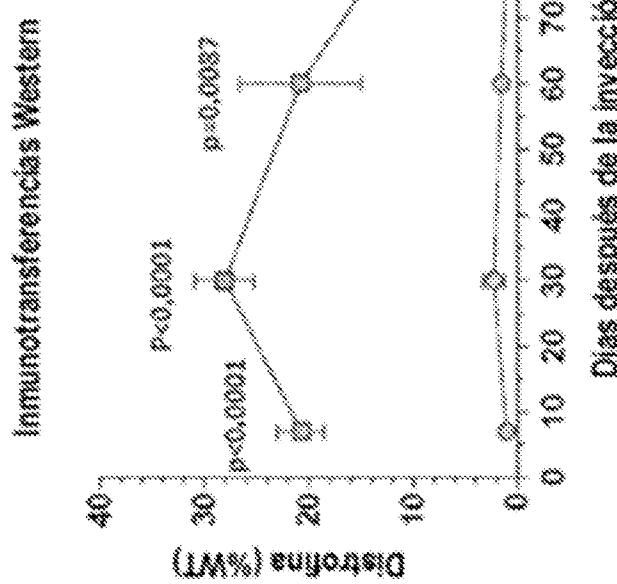


Figura 7B

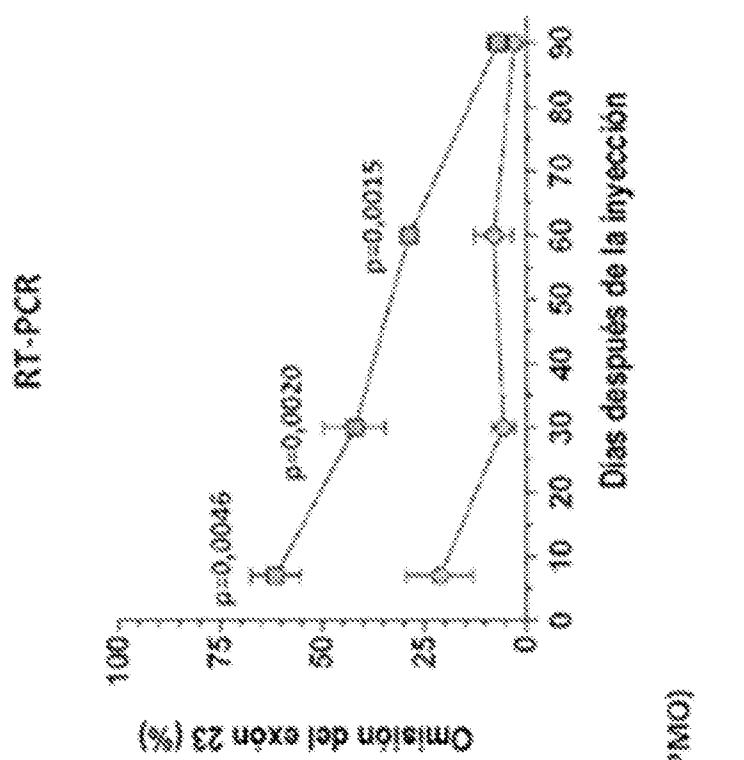


Figura 8A

7 días      30 días

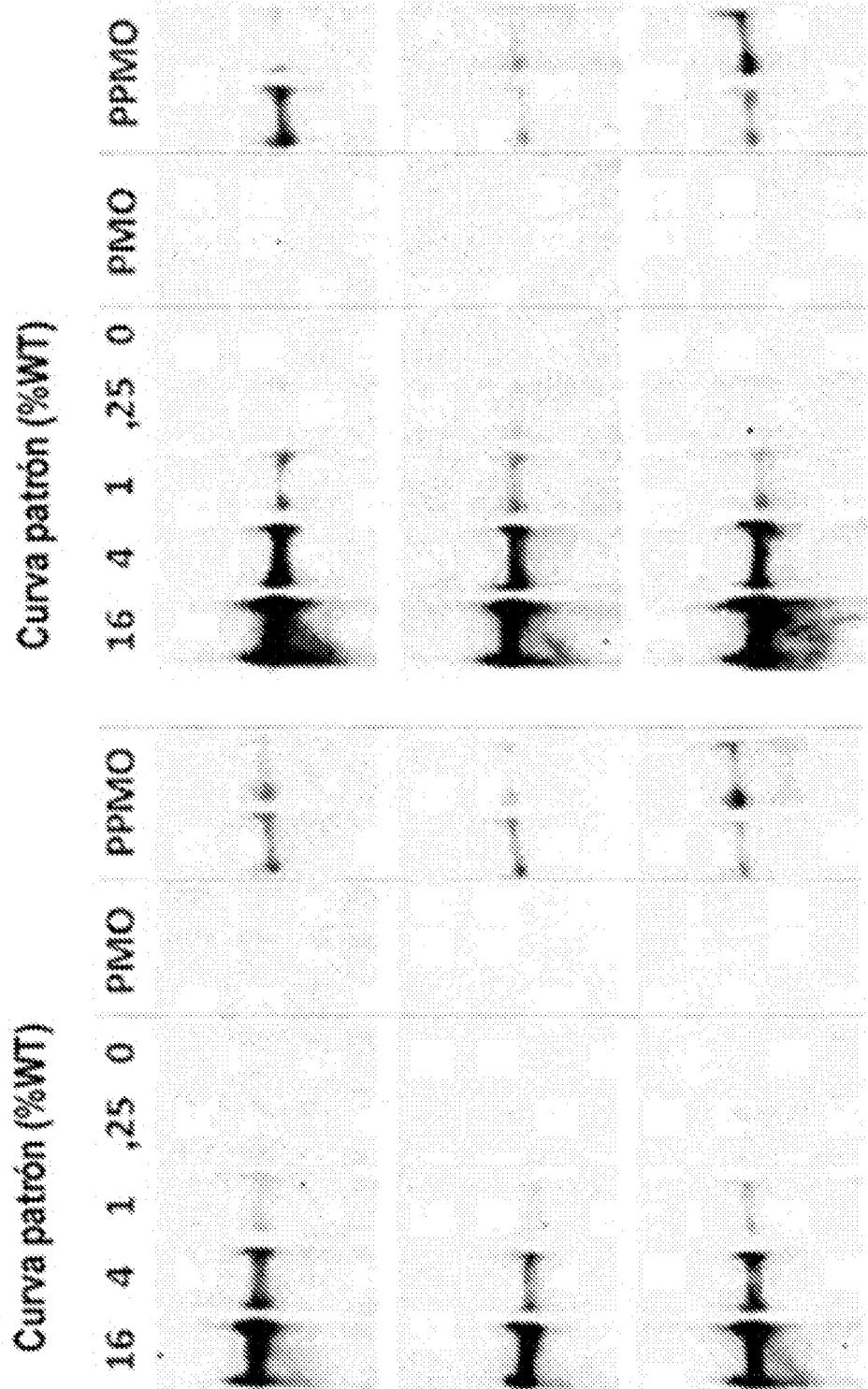


Figura 8C

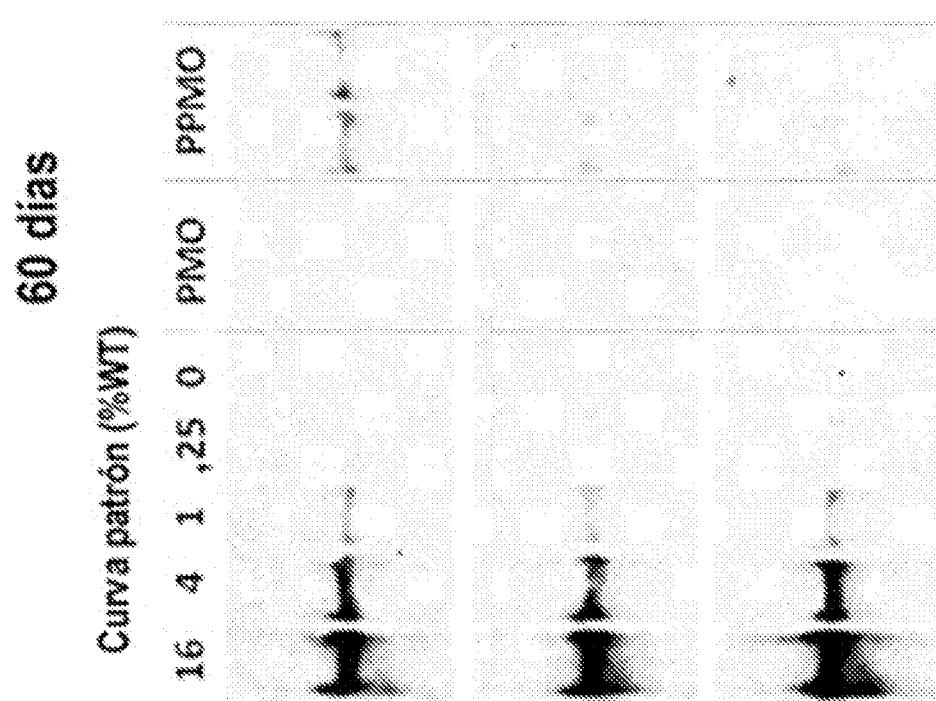


Figura 8D

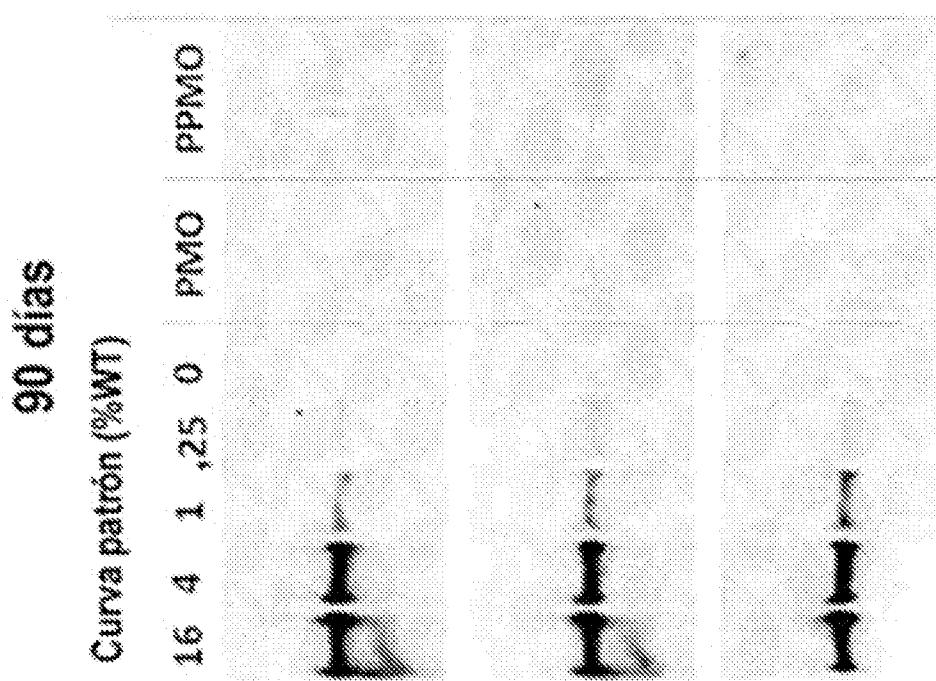
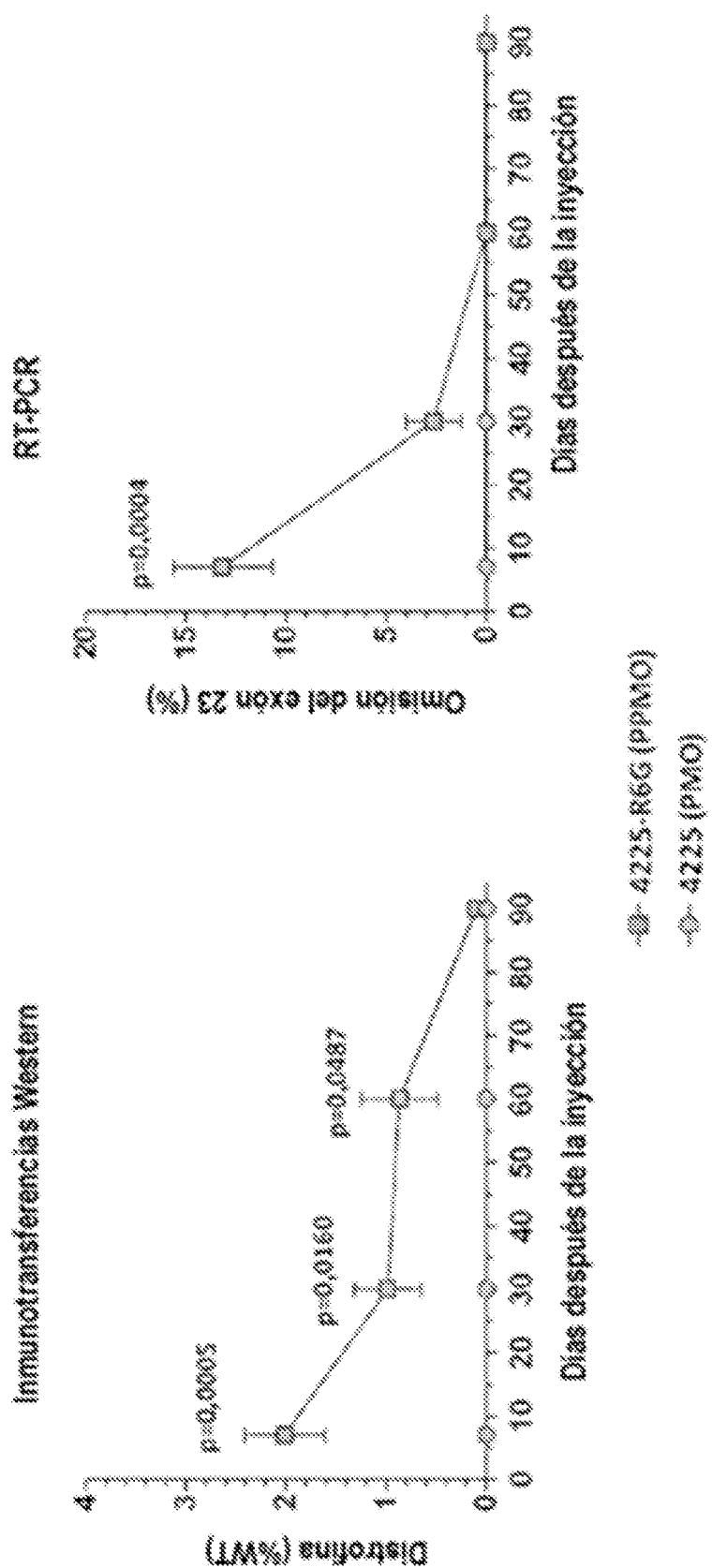


Figura 9A



# ES 2 980 686 T3

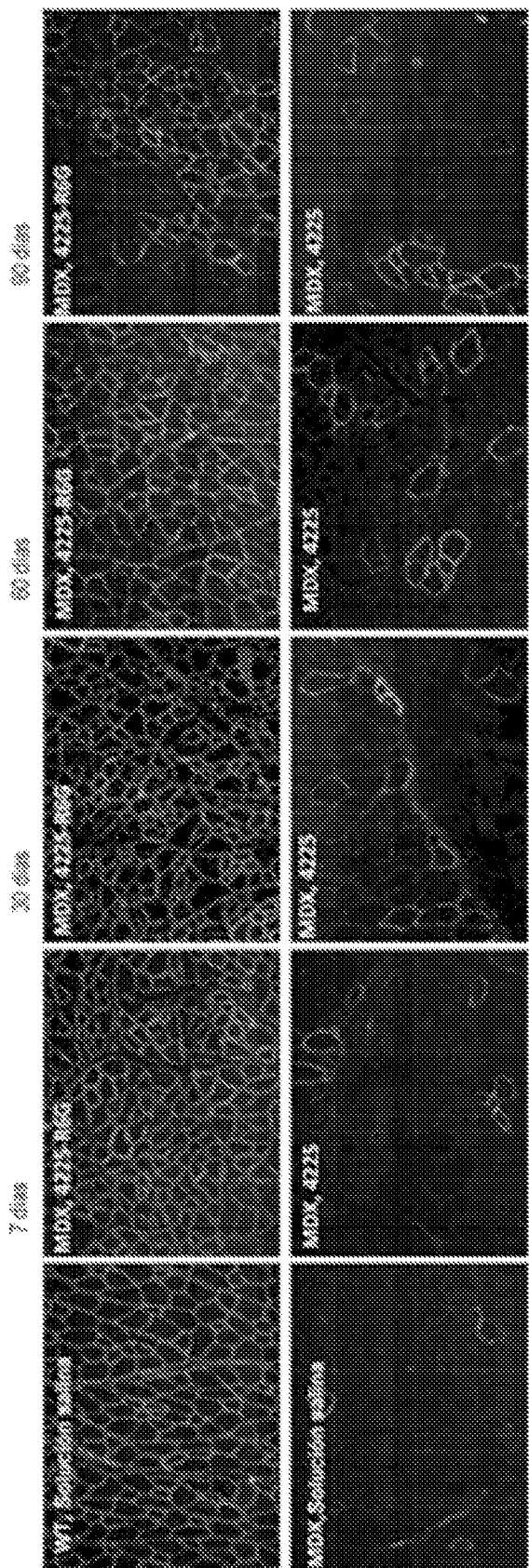


Figure 10

Figura 11B

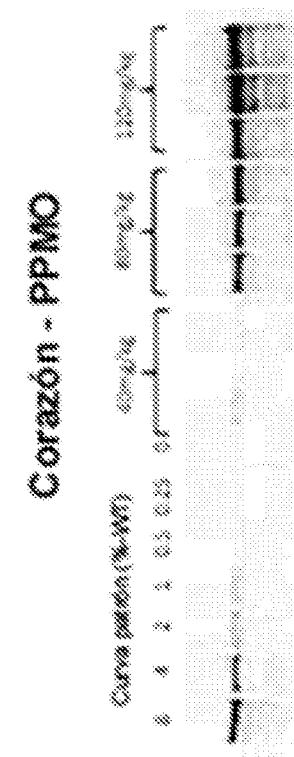
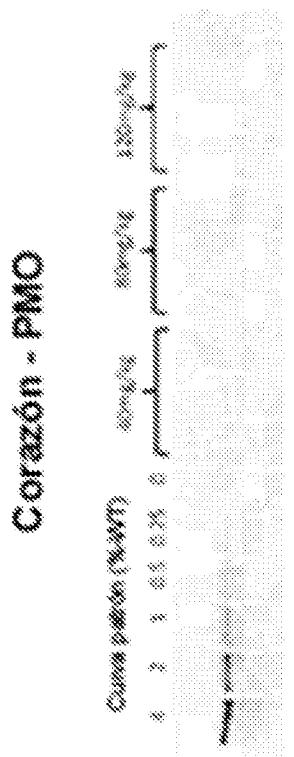


Figura 11A



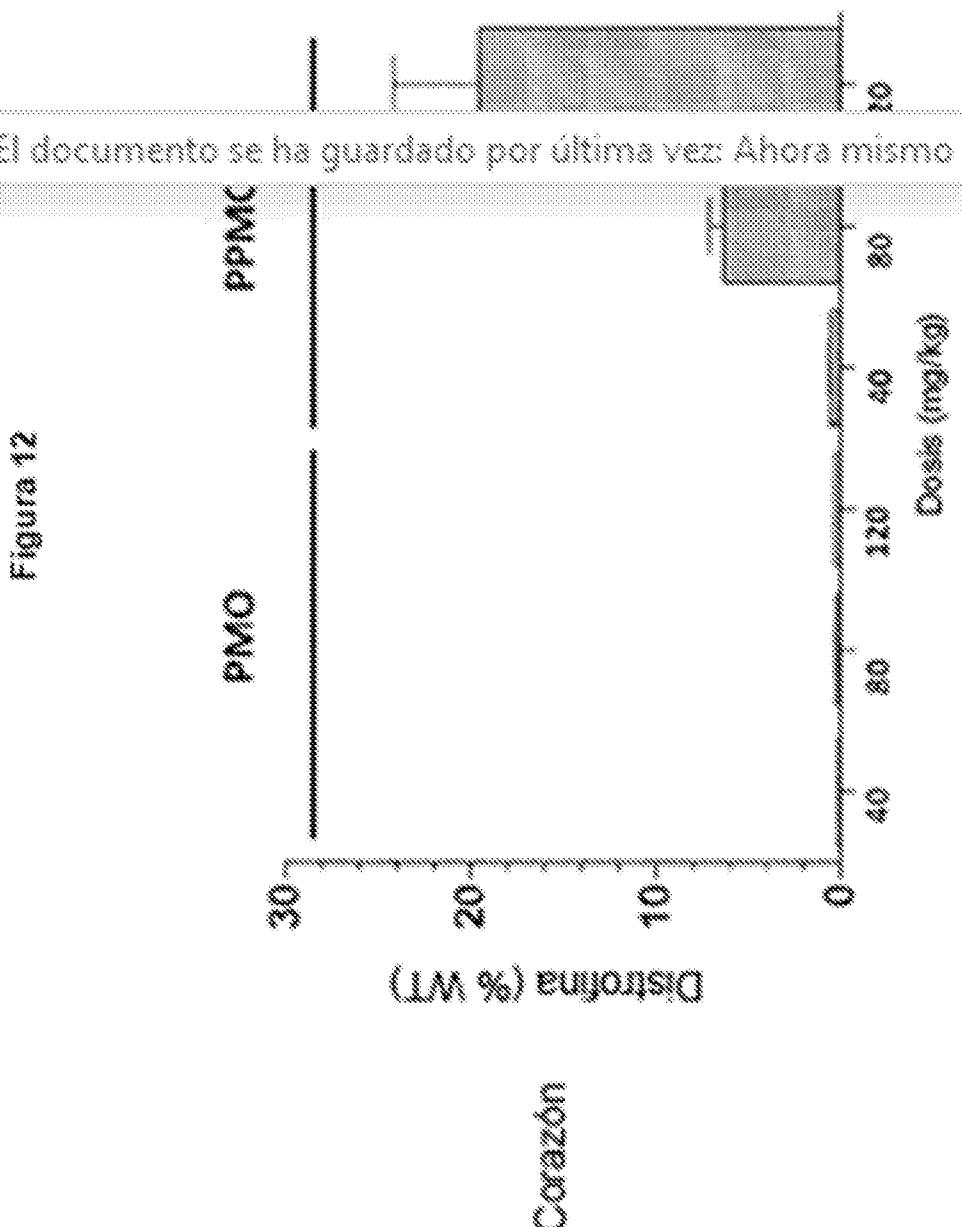


Figura 42

Figura 13A

**Diaphragma - PMS**

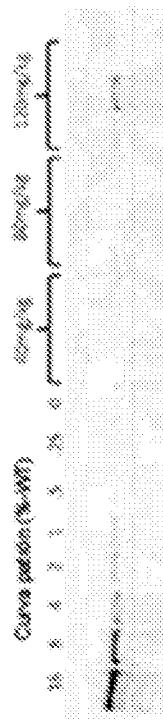


Figura 13B

**Diaphragma - PPMS**

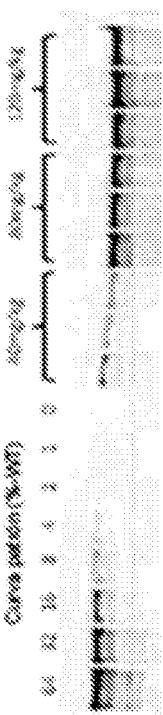


Figura 13B

Figura 13B

**Diaphragma - PPMS**

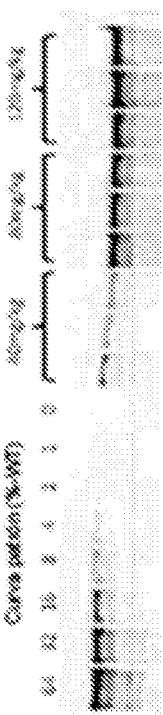
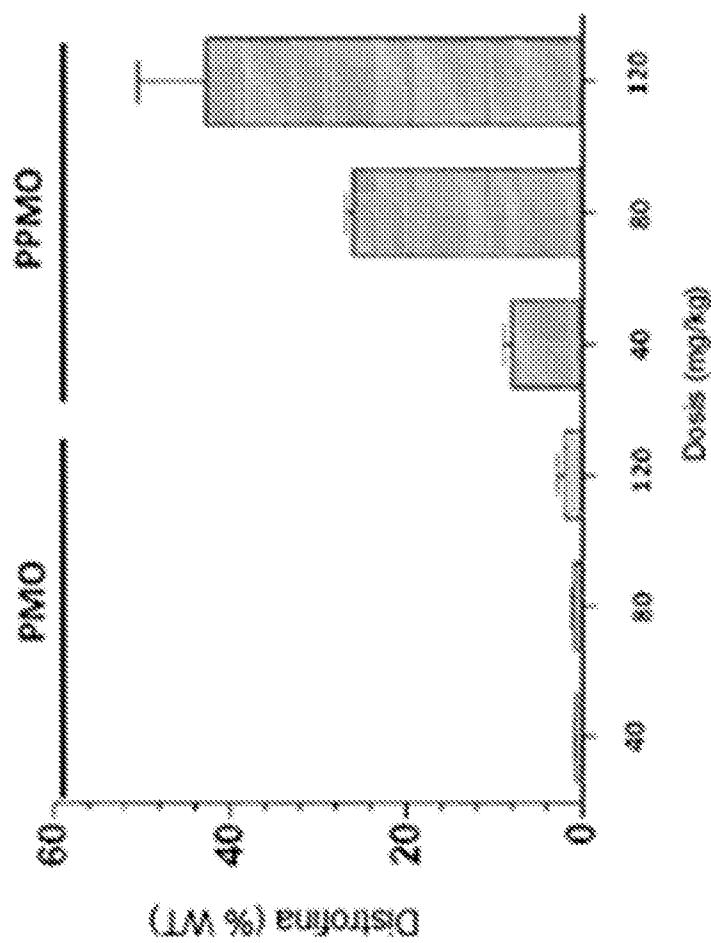


Figura 14



DiIfragma

Figura 15A  
Cubitticeps - pPMO

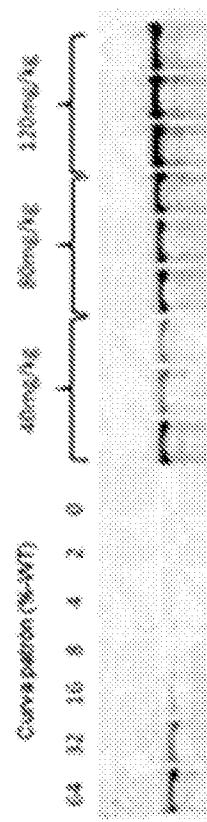
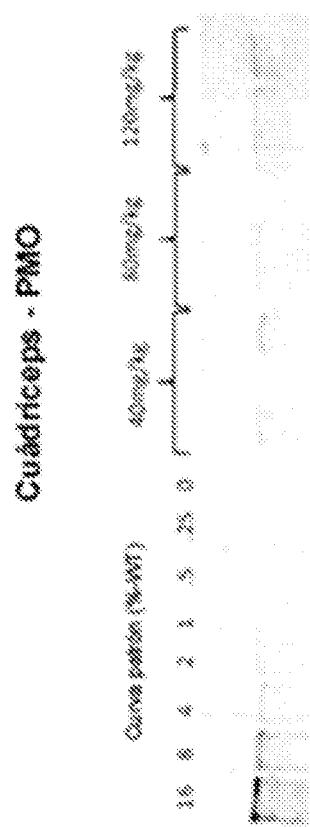
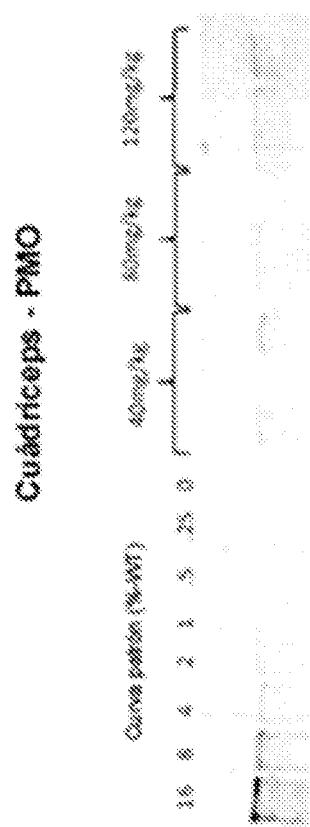
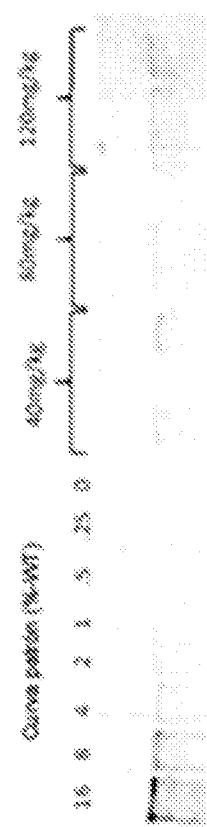
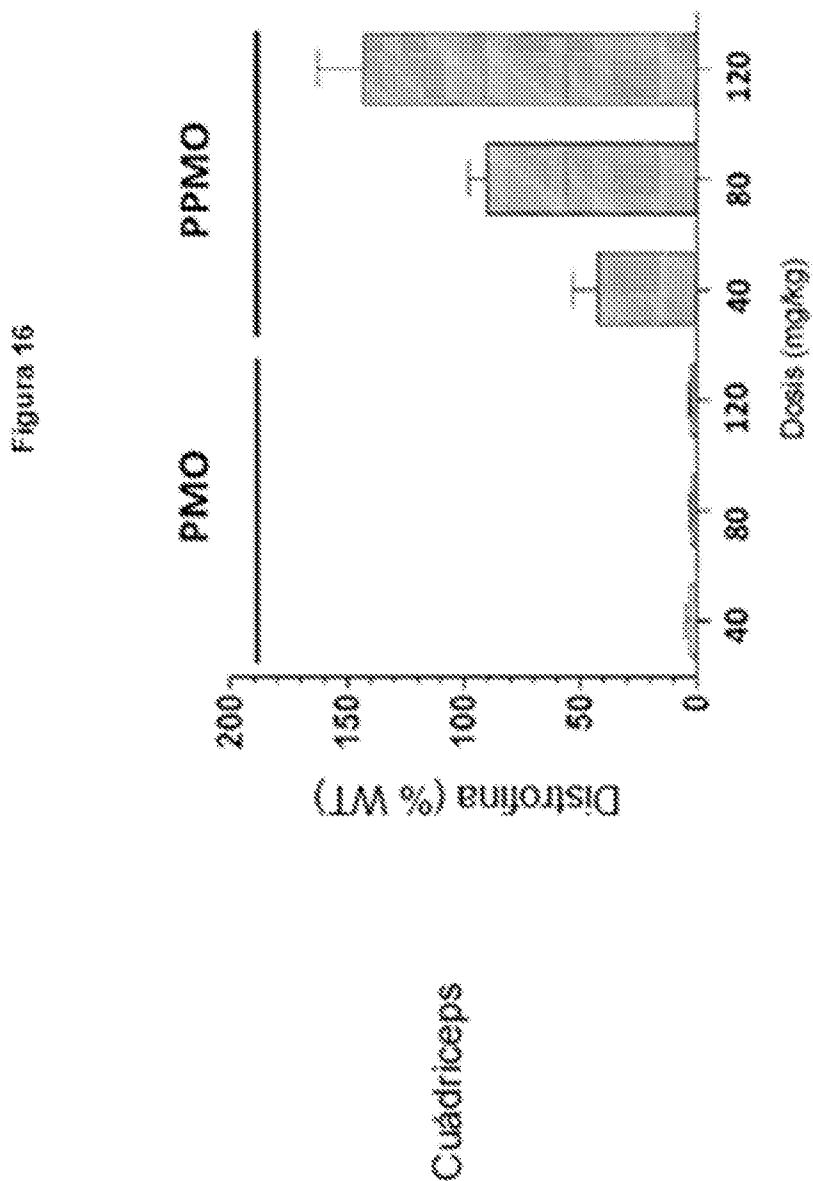


Figura 15B  
Cubitticeps



Cubitticeps - pMO





Ciclo N° Subunidad (SU)	Tratamiento pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Ciclo de acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE al 30% DCM	Solución de CYTFA <sup>a</sup>	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU (g) NEM (l) DM (l)	Tiempo de acoplamien- to a TA (h)	Lavado con DCM	Lavado con TFE al 30% DCM
1.C	5,5L	a) 5,5L b) 5,5L, 122ml	3x5,5L	5,5L	584g; 195 ml NEM; 3,2LDMI	5	5,5L	2x5,5L
2.A	7,0L	a) 7L b) 7L, 158ml	3x7L	2x7L	582,2g and 195ml NEM 3,2LDMI	4,25	7L	2x7L
3.A	8L	a) 8L b) 8L, 162ml	3x8L	2x8L	582,2g; 195ml NEM; 3,4LDMI	4,25	8L	2x8L
4.T	9L	a) 9L b) 9L, 206ml	3x9L	2x9L	514,2g; 195ml NEM; 3,6LDMI	4,25	9L	2x9L
5.G	9,5L	a) 9,5L b) 9,5L, 230ml	3x9,5L	2x9,5L	765,5g; 195ml NEM; 3,4LDMI	4,25	9,5L	2x9,5L
6.C	10L	a) 10L b) 10L, 232ml	3x10L	2x10L	584,4g; 195ml NEM; 3,45L DMI	4,25	10L	2x10L
7.C	11L	a) 11L b) 11L, 256ml	3x11L	2x11L	584,5g; 195ml NEM; 3,57L DMI	4,25	11L	2x11L
8.A	11L	a) 11L b) 11L, 258ml	3x11L	2x11L	592,5g; 195ml NEM; 3,64L DMI	4,25	11L	2x11L
9.T	11,5L	a) 11,5L b) 11,5L 268ml	3x11,5L	2x 11,5L	514,5g; 195ml NEM;	4,25	11,5L	2x11,5L

Figura 17

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

Ciclo N° Subunidad (SU)	Tratamiento pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Ciclo de acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
	Lavado con TFE al 30% DCM	Solución de CYTFA	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU (g) NEM (I) DM (II)	Tiempo de acoplamiento a TA (h)	Lavado con DCM	Lavado con TFE al 30% DCM
					3,72L DMI			
10:C	12L	a) 12L b) 12L, 280ml	3x12L	2x12L	338,5g; 195ml NEM; 3,86L DMI	4,25	12L	2x12L
11:C	13,5L	a) 13,5L b) 13,5L, 284ml	3x13,5L	2x 13,5L	770,4g; 253ml NEM; 4,02L DMI	4,25	13,5L	2x13,5L
12:T	13,5L	a) 13,5L b) 13,5L, 284ml	3x13,5L	2x 13,5L	668,7g; 253ml NEM; 4,02L DMI	4,25	13,5L	2x13,5L
13:OPG	14L	a) 14L b) 14L, 216ml	3x14L	2x14L	982,3g; 253ml NEM; 4,02L DMI	4,25	14L	2x14L
14:OPG	14,5L	a) 14,5L b) 14,5L, 228ml	3x14,5L	2x 14,5L	982,3g; 253ml NEM; 4,1L DMI	4,25	14,5L	2x14,5L
15:A	15,5L	a) 15,5L b) 15,5L, 254ml	3x15,5L	2x 15,5L	770,1g; 253ml NEM; 4,26L DMI	4,25	15,5L	2x15,5L
16:OPG	15,5L	a) 15,5L b) 15,5L, 254ml	3x15,5L	2x 15,5L	982,4g; 253ml NEM; 4,28L DMI	4,25	15,5L	2x15,5L
17:T	16L	a) 16L b) 16L, 366ml	3x16L	2x16L	549,6g; 253ml NEM;	4,75	16L	2x16L

Figura 17 (continuación)

Ciclo N° Subunidad (SU)	Tratamiento pre-acoplamiento				Ciclo de acoplamiento		Ciclo de acoplamiento	
	1	2	3	4			1	2
Lavado con TFE al 30% DCM	Solución de CYTFA	Solución de neutralización	Lavado con DCM	Cantidad de SU (g) NEM (l) DM (l)	Tiempo de acoplamiento a TA (h)	Lavado con DCM	Lavado con TFE al 30% DCM	
				4,4LDMI				
18:T	16,5L	a) 16,5L b) 16,5L, 378ml	3x16,5L	2x 16,5L	630,7g; 253ml NEM; 4,4LDMI	4,25	16,5L	2x16,5L
19:C	16,5L	a) 16,5L b) 16,5L, 378ml	3x16,5L	2x 16,5L	770,4g; 253ml NEM; 4,57L DMI	4,25	16,5L	2x16,5L
20:C	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	3x17L	2x17L	770,4g; 263ml NEM; 4,57L DMI	4,75	17L	2x17L
21:T	17L	a) 17L b) 17L, 390ml	2x17L	2x17L	776,4g; 311ml NEM; 4,72L DMI	4,25	17L	2x17L
22:DPG	17,5L	a) 17,5L b) 17,5L, 402ml	3x17,5L	2x 17,5L	1208,7g; 311ml NEM; 4,72L DMI	4,75	17,5L	2x17,5L

Figura 17 (continuación)

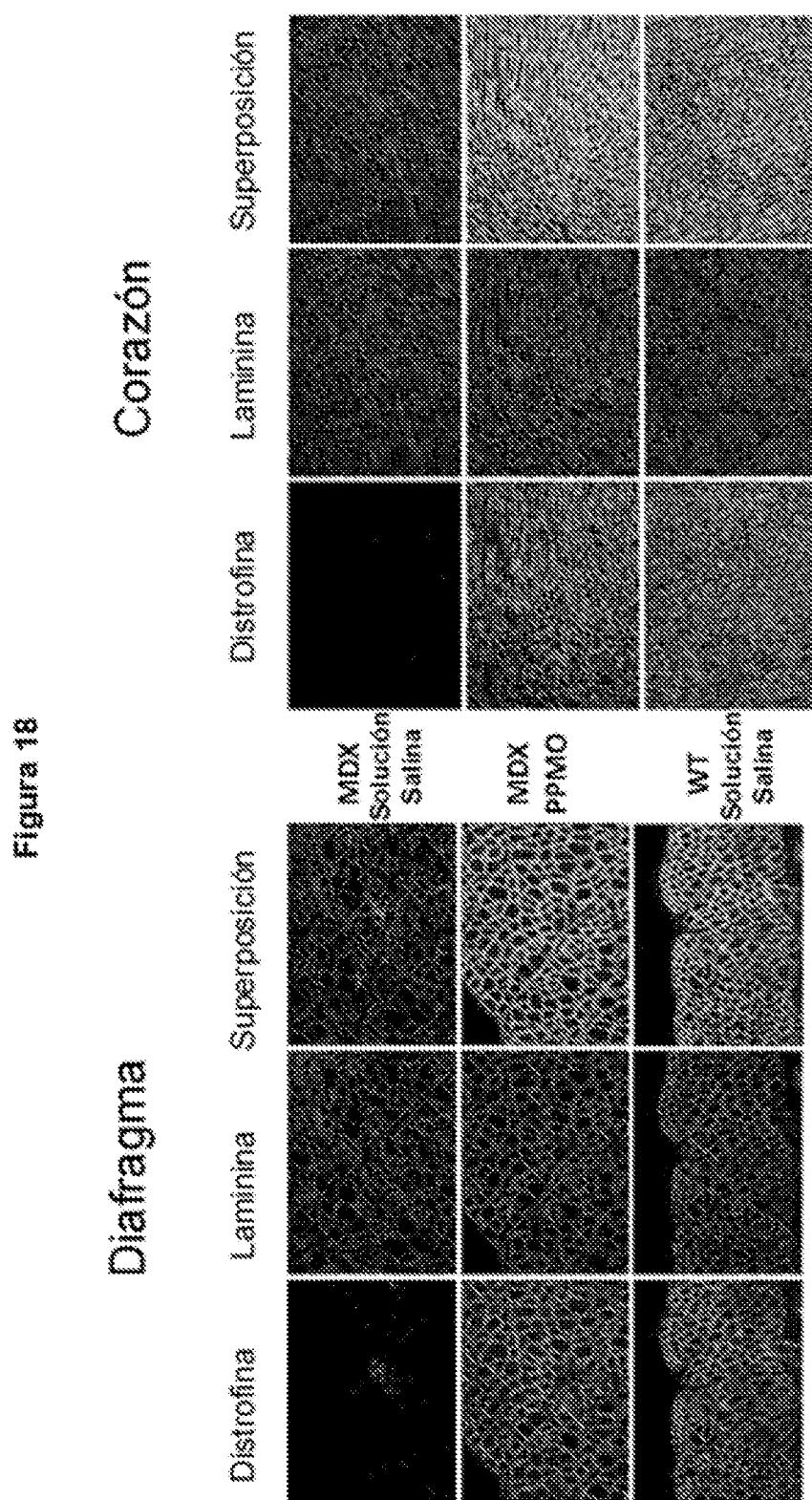


Figura 19

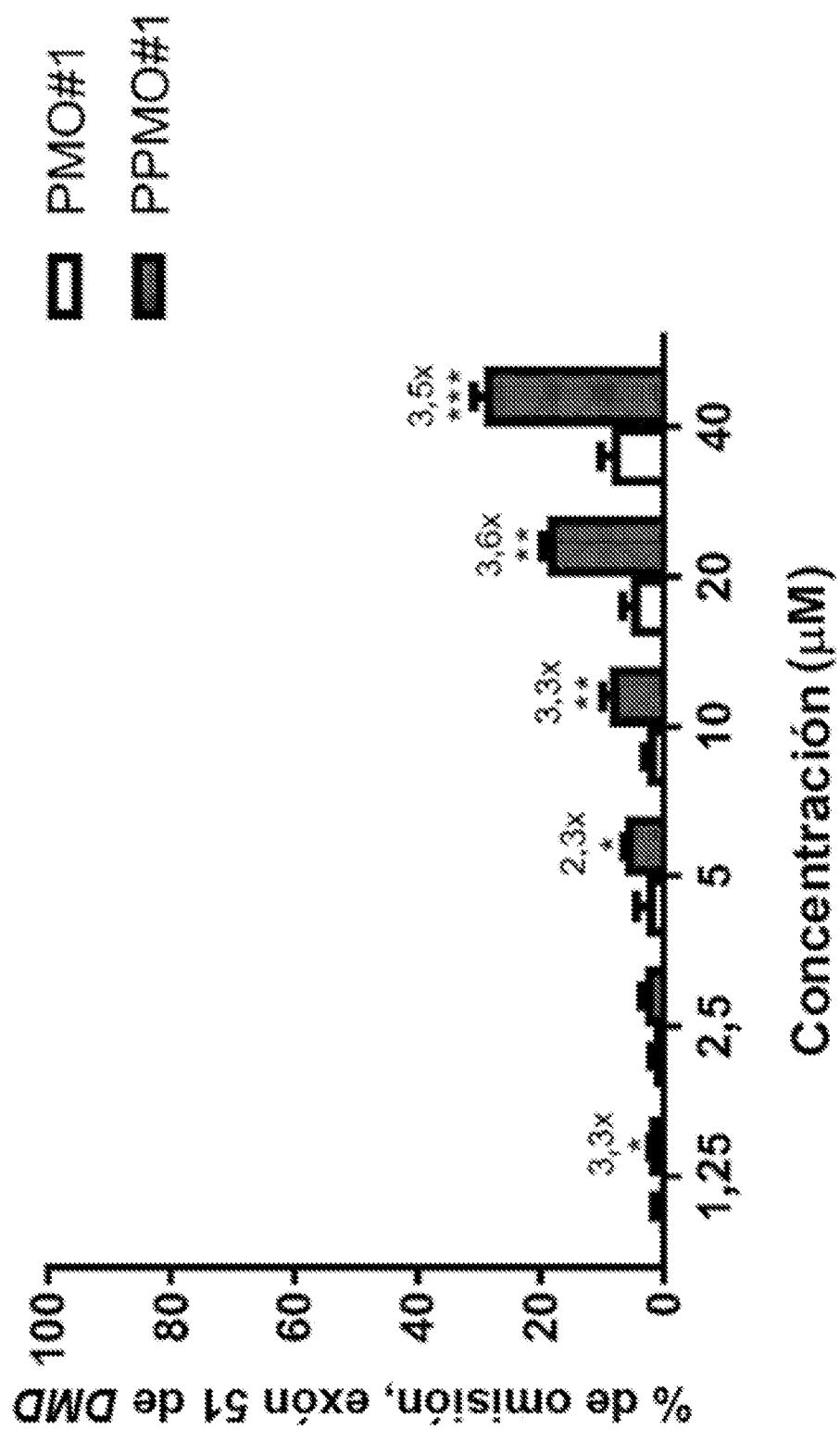


Figura 20

