

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 726**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2008 PCT/US2008/008168**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.01.2009 WO09005793**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2008 E 08768848 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2170363**

54 Título: **Conjugados peptídicos específicos de tejido y métodos**

30 Prioridad:

29.06.2007 US 937725 P

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

26.12.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MOULTON, HONG, M. y
IVERSEN, PATRICK, L.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 694 726 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 peptídicos específicos de tejido y métodos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a péptidos de penetración celular útiles para la biodistribución específica del tejido de conjugados que contienen péptidos, y los métodos de selección de dichos péptidos para su uso en los tejidos seleccionados.

10

Referencias

- Abes, S., H.M. Moulton et al. (2006). "Vectorization of morpholino oligomers by the (R-Ahx-R)₄ peptide allows efficient splicing correction in the absence of endosomolytic agents." *J Control Release* 116(3): 304-13. Arap, W. et al. (2004). "Human and mouse targeting peptides identified by phage display." U.S. Appn. Pubn. No. 20040170955.
- Behlke, M. A. (2006). "Progress towards *in vivo* use of siRNAs." *Mol Ther* 13(4): 644-70.
- Alter, J., F. Lou et al. (2006). "Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology." *Nat Med* 12(2): 175-7.
- 20 Chen, C.P., L.R. Zhang et al. (2003). "A concise method for the preparation of peptide and arginine-rich peptide-conjugated antisense oligonucleotide." *Bioconjug Chem* 14(3): 532-8.
- Gebiski, B.L., C.J. Mann et al. (2003). "Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle." *Hum Mol Genet* 12(15): 1801-11.
- Jearawiriyapaisam, Moulton et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." *Mol Therapy*, June 10, 2008 (avance de publicación en internet).
- 25 Kang, S.H., M.J. Cho et al. (1998). "Up-regulation of luciferase gene expression with antisense oligonucleotides: implications and applications in functional assay development." *Biochemistry* 37(18): 6235-9. Kolonin, M.G., J. Sun et al. (2006). "Synchronous selection of homing peptides for multiple tissues by *in vivo* phage display." *FASEB J* 20(7): 979-81.
- 30 Meade, B.R. y S.F. Dowdy (2007). "Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides." *Adv Drug Deliv Rev* 59(2-3): 134-40.
- Richard, J.P., K. Melikov et al. (2003). "Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake." *J Biol Chem* 278(1): 585-90.
- Rothbard, J.B., E. Kreider et al. (2002). "Arginine-rich molecular transporters for drug delivery: role of backbone spacing in cellular uptake." *J Med Chem* 45(17): 3612-8.
- 35 Samoylova, T.I. y B.F. Smith (1999). "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening." *Muscle Nerve* 22(4): 460-6.
- Sazani, P., F. Gemignani et al. (2002). "Systemically delivered antisense oligomers upregulate gene expression in mouse tissues." *Nat Biotechnol* 20(12): 1228-33.
- 40 Sontheimer, E. J. (2005). "Assembly and function of RNA silencing complexes." *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(2): 127-38. Vodyanoy, V. et al. (2003). "Ligand sensor devices and uses thereof." U.S. Appn. Pubn. No. 20030640466.
- Wu, R.P., D.S. Youngblood et al. (2007). "Cell-penetrating peptides as transporters for morpholino oligomers: effects of amino acid composition on intracellular delivery and cytotoxicity." *Nucleic Acids Res.* 35(15):5182-91. (Epub 2007 Aug 1.)
- 45 Youngblood, D.S., S.A. Hatlevig et al. (2007). "Stability of cell-penetrating peptide-morpholino oligomer conjugates in human serum and in cells." *Bioconjug Chem* 18(1): 50-60.

Antecedentes de la invención

50 La utilidad práctica de muchos fármacos que tienen una actividad biológica potencialmente útil a menudo está dificultada por problemas en el suministro de dichos fármacos a sus dianas. El suministro de fármacos y otros compuestos a las células se produce en general a partir de un entorno celular acuoso y conlleva la penetración de una membrana celular lipófila para conseguir entrar en la célula.

55 Los oligonucleótidos y sus análogos son una clase de fármacos potencialmente útiles cuya utilidad práctica se ha impedido debido a la captación celular insuficiente, y se ha propuesto por tanto para aumentar la captación de oligonucleótidos mediante la conjugación con péptidos ricos en arginina que contienen aminoácidos no a (véase, por ejemplo, Chen, Zhang et al. 2003; Abes, Moulton et al. 2006; Youngblood, Hatlevig et al. 2007; y Wu et al. 2007). Se ha informado que el uso de péptidos ricos en arginina para el transporte de fármacos terapéuticos, más en general (Rothbard, Kreider et al. 2002).

60 Los estudios por los inventores y otros (Chen, Zhang et al. 2003; Abes, Moulton et al. 2006; Youngblood, Hatlevig et al. 2007) han establecido que la incorporación de aminoácidos no naturales puede conferir un aumento de estabilidad a los vehículos peptídicos y aumenta la actividad antisentido de oligómeros conjugados, y por lo tanto mejoran el potencial de los CPP (péptidos de penetración celular) para suministrar macromoléculas terapéuticas. A

pesar de estos avances, sigue existiendo la necesidad de CPP con mejores características, y en particular, con una captación celular optimizada en un tejido diana seleccionado.

El documento WO2007/056466 describe compuestos análogos de oligonucleótidos antisentido que tienen una secuencia de direccionamiento complementaria a un ARNR CTLA-4 pre-procesado y el uso de los compuestos para el tratamiento o prevención de una afección autoinmunitaria o rechazo de trasplantes.

Burrer et al., (Journal of Virology, June 2007, 81(11), 5637-5648) describen los efectos antivíricos de los oligómeros de morfolino antisentido en modelos de infección por coronavirus murino.

Sumario de la invención

Los inventores describen en el presente documento un método para la identificación de un péptido de penetración celular útil para dirigir un compuesto terapéutico, normalmente un compuesto oligomérico antisentido, a un tejido de mamífero seleccionado. El método incluye las etapas de:

(a) formación de una biblioteca de conjugados peptídicos compuesta por:

- (i) una pluralidad de diferentes péptidos, cada uno de 8 a 30 restos de aminoácidos de longitud, y preferentemente 8 a 20 restos de aminoácidos de longitud, y que consiste en subsecuencias seleccionadas de entre el grupo que consiste en RXR, RX, RB Y RBR; en el que R es arginina (preferentemente L-arginina), B es (β-alanina, y cada X es independientemente -C(O)-(CHR¹)_n-NH-, donde n es 4-6 y cada R¹ es independientemente H o metilo, de manera que como mucho dos R¹ son metilos, y
- (ii) un compuesto marcador acoplado covalentemente a cada péptido mediante un enlace X, B, o XB, cuya concentración se pueden ensayar en las células del tejido seleccionado;

(b) administración de cada conjugado peptídico a un sujeto mamario;

(c) ensayo del nivel del compuesto marcador en las células del tejido seleccionado, después de un periodo suficiente para la a localización del conjugado peptídico administrado en el tejido seleccionado de un sujeto mamífero; y

(d) seleccionar un péptido de penetración celular útil para el direccionamiento de un compuesto terapéutico a un tejido de mamífero, basándose en su capacidad para producir el mayor o casi el mayor de entre un grupo que tiene secuencia identificadas por las SEQ ID NO: 6-27. Cada resto X del péptido puede ser un ácido 6-aminohexanoico, el péptido puede contener al menos tres restos X, y puede comprender una combinación de subsecuencias (RXR) y (RBR). De manera alternativa, cada resto X puede ser un ácido 6-aminohexanoico, el péptido puede contener al menos tres restos X, y puede comprender una combinación de subsecuencias (RX) y (RB).

El péptido normalmente se une al compuesto marcador en uno de los extremos, preferentemente el extremo N, mediante un enlace que consiste en uno o dos restos de aminoácidos seleccionados de entre el grupo que consiste en ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminopentanoico, ácido 7-aminohexanoico y β-alanina (siendo dichos enlaces realizaciones de X, B, y XB como se ha descrito anteriormente).

El compuesto marcador en la biblioteca de conjugados puede ser un marcador fluorescente, en el que la etapa de ensayo incluye el examen de las células del tejido seleccionado en cuanto a la presencia de un marcador fluorescente interiorizado. Preferentemente, el compuesto marcador de la biblioteca de conjugados es un oligómero antisentido, que también puede estar marcado de manera fluorescente. Preferentemente, el oligómero antisentido es eficaz para producir la omisión de exón o un corte y empalme aberrante corregido en una proteína celular seleccionada o indicador genético, en el que la etapa de ensayo incluye el examen de productos proteicos producidos por las células del tejido seleccionado en cuanto a la presencia de la proteína celular seleccionada de forma truncada indicando dicha omisión del exón o corrección del corte y empalme.

Dicho compuesto marcador de oligonucleótido antisentido puede ser un oligonucleótido de fosforoamidato de morfolino, y adicionalmente, un oligonucleótido de fosforoamidato de morfolino que contienen entre un 20-50 % de enlaces de armazón cargados positivamente.

Los inventores describen el presente documento péptidos selectivos de tejido que tienen una estructura como la mencionada anteriormente, tal como péptidos que tienen una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 14-27 posteriormente, y en particular, péptidos que tienen una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 19-27. Otras clases de péptidos preferidos incluyen los que cada resto X del péptido es un ácido 6-aminohexanoico, el péptido contiene al menos tres restos X, comprende una combinación de subsecuencias (RXR) y (RBR); y en los que cada resto X es un ácido 6-aminohexanoico, el péptido contiene al menos tres restos X, y comprende una combinación de subsecuencias (RX) y (RB). La invención proporciona un péptido de penetración celular que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19.

- Los inventores describen en el presente documento un método de preparación de un conjugado terapéutico para su uso en el tratamiento de una afección de enfermedad asociada con un tejido seleccionado en un tejido de un sujeto mamífero, que comprende las etapas de: (a) identificar un péptido de penetración celular para el tejido seleccionado, seleccionado por el método descrito anteriormente, (b) seleccionar un compuesto terapéutico que sea eficaz contra la afección de enfermedad cuando se localiza en las células del tejido seleccionado, y (c) la conjugación del compuesto terapéutico en un extremo del péptido de penetración celular seleccionado. Preferentemente, el compuesto terapéutico es un oligómero antisentido, y más preferentemente un PMO como se define en el presente documento.
- El método de preparación del conjugado también puede incluir la conjugación de un péptido de asentamiento que es selectivo del tejido seleccionado en el otro extremo del péptido de penetración celular, para formar un conjugado con la forma: péptido de penetración celular - péptido de asentamiento – compuesto terapéutico, o de manera alternativa y preferentemente, de la forma: péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – compuesto terapéutico.
- En un aspecto, la invención proporciona un péptido antisentido conjugado para el tratamiento de una afección de enfermedad determinada, que comprende un oligómero antisentido de morfolino fosforodiamidato dirigido contra un gen cuya expresión se asocia con dicha afección de enfermedad en un tejido diana específico, y se une covalentemente al mismo, mediante un enlace XB, un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de $(RXRRBR)_2$, donde R es arginina, que puede incluir D-arginina; B es β -alanina; y cada X es independientemente un aminoácido neutro lineal $-C(O)-(CH_2)_n-NH-$, donde n es 4-6, donde el péptido de penetración celular localiza selectivamente el oligómero antisentido en el tejido diana. Preferentemente, n es 5, de manera que cada X es un resto de ácido 6-aminohexanoico. En más realizaciones preferidas, el oligómero de morfolino fosforodiamidato contiene aproximadamente un 20-50 % de enlaces de armazón cargados positivamente, como se describe adicionalmente con posterioridad.
- En los conjugados péptido-oligómero descritos en el presente documento, el extremo conjugado es preferentemente el extremo N del péptido.
- Los oligómeros antisentido para tratar determinadas afecciones de enfermedad, normalmente inhibiendo la expresión genética o modulando el corte y empalme genético, se pueden diseñar de acuerdo con metodologías conocidas en la técnica, y las secuencias ejemplares proporcionadas en el presente documento.
- Los inventores describen en el presente documento un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto mamífero, en el que el péptido tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO: 23, y el oligómero antisentido se dirige contra un receptor proteico de andrógenos humanos; un compuesto peptídico conjugado para su uso en la enfermedad renal poliquística de un sujeto mamífero, en el que el péptido o tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 13, 14, 21 y 27, y el oligómero antisentido se dirige contra la proteína c-myc humana; un compuesto peptídico conjugado para aumentar la proliferación y supervivencia de células madre en la sangre periférica, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 10, 14, 19, y 27, y el oligómero antisentido se dirige contra el TGF- β humano; un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento de la restenosis cardíaca, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 19 y 21, y el oligómero antisentido se dirige contra la c-myc humana; un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento de una infección vírica respiratoria, en el que el péptido tiene la secuencia identificada por SEQ ID NO: 10, y el oligómero antisentido se dirige contra el virus de influenza A o el virus sincitial respiratorio; un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento de una infección bacteriana respiratoria, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo identificado por las SEQ ID NO: 13, 14, y 19, y el oligómero antisentido se dirige contra un ARNr 16S bacteriano; un compuesto peptídico conjugado para su uso en la redirección metabólica de un compuesto xenobiótico metabolizado normalmente en el hígado, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 19, 23, 24 y 25; y el oligómero antisentido se dirige contra una enzima P450 hepática; un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento de hepatitis vírica, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las 19, 23, 24 y 25; y el oligómero antisentido se dirige contra el virus de la hepatitis C o el virus de la hepatitis B; un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria en un sujeto mamífero, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 19, 23, 24, y 25, y el oligómero antisentido es eficaz para inducir la expresión de un receptor de TNF- α ; un compuesto peptídico conjugado en el tratamiento de una afección inmunitaria en un sujeto mamífero, en el que el péptido tiene una secuencia representada por la SEQ ID NO: 27, y el oligómero antisentido es eficaz para suprimir la expresión de IL-10, CTLA-4 o cFLIP en los leucocitos; un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento de la pérdida de masa de musculatura esquelética en un sujeto humano, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 13, 19 y 20, y el oligómero antisentido se dirige contra la miostatina humana; y

un compuesto peptídico conjugado para su uso en la distrofia muscular de Duchenne, en el que el péptido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 13, 19, y 20, y el oligómero antisentido es eficaz para producir una omisión de exón en la proteína distrofina humana. En una realización de este conjugado, el péptido tiene la secuencia identificada como la SEQ ID NO: 19, y el oligómero antisentido tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34 y 49.

En general, el conjugado péptido-oligómero puede comprender adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo para el tejido de mamífero seleccionado, es decir, el mismo tejido al que se dirige el péptido penetrante celular. El conjugado puede estar en la forma de péptido de penetración celular – péptido de asentamiento – oligómero antisentido, o, más preferentemente, de la forma péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido. Por ejemplo, un compuesto peptídico conjugado para su uso en el tratamiento de distrofia muscular de Duchenne, como se ha descrito anteriormente, puede comprender adicionalmente un péptido de asentamiento que sea selectivo del tejido muscular, tal como el péptido que tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO: 51, conjugado con el péptido de penetración celular. Los conjugados ejemplares de este tipo incluyen los representados en el presente documento como CP06062-PMO (péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido) y MSP-CP6062-PMO (péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido) (véase la Tabla de Secuencias adjunta).

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un método para preparar una composición antisentido útil para tratar la distrofia muscular de Duchenne o una enfermedad muscular debilitante en un sujeto mamífero que comprende la preparación de un oligómero antisentido eficaz para suprimir truncados de variantes de corte y empalme en la distrofina proteica expresada, o eficaz para suprimir la expresión de miostatina en el tejido muscular, respectivamente, cuando se administra a un sujeto mamífero, y conjugando al oligómero un péptido de penetración celular que tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO: 19. El método puede incluir adicionalmente la conjugación de un péptido de asentamiento en el músculo tal como las SEQ ID NO: 51-55, al oligómero y el péptido de penetración celular, para formar una composición péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido.

También se proporciona un método para la preparación de una composición antisentido útil para el tratamiento de una afección inflamatoria en un sujeto mamífero que comprende la preparación de un oligómero antisentido eficaz para inducir la expresión de un receptor TNF- α soluble, cuando se administra el oligómero a un sujeto mamífero (por ejemplo, SEQ ID NO: 33), y conjugando al oligómero un péptido de penetración celular que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19. El método puede incluir adicionalmente la conjugación de un péptido de asentamiento hepático, tal como SEQ ID NO: 76, al oligómero y el péptido de penetración celular, para formar una composición de péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido.

Los inventores describen en el presente documento una mejora del método para la preparación de una composición antisentido para el tratamiento de una afección inmunitaria en un sujeto mamífero preparando un oligómero antisentido eficaz para suprimir la expresión de IL-10, CTLA-4 o cFLIP en leucocitos, cuando se administra a un sujeto mamífero, en el que la mejora comprende la conjugación del oligómero un péptido de penetración celular que tiene una secuencia identificada como la SEQ ID NO: 27. La mejora puede incluir adicionalmente la conjugación de un péptido de asentamiento de leucocitos con el oligómero y el péptido de penetración celular, para formar una composición de péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido.

Los inventores describen en el presente documento un conjugado fármaco-péptido para tratar una afección de enfermedad, que comprende un compuesto terapéutico o fármaco cuya acción se dirige contra un tejido diana específico, y unido covalentemente al mismo, mediante un enlace X, B o XB, un péptido de penetración celular que comprende 8 a 20 restos de aminoácidos y consiste en una combinación de subsecuencias (RXR) y (RBR), o una combinación de subsecuencias (RX) y (RB), en el que R es arginina; B es β -alanina; y cada X es independientemente un aminoácido lineal neutro -C(O)-(CH₂)_n-NH-, en el que n es 4-6, y es preferentemente 5; en el que el péptido de penetración celular localiza el fármaco en el tejido diana.

Como se ha descrito anteriormente, el conjugado fármaco-péptido puede comprender adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo para un tejido de mamífero, es decir, el mismo tejido al que se dirige el péptido de penetración celular. El conjugado puede tener la forma de péptido de penetración celular – péptido de asentamiento-fármaco, o, más preferentemente, en forma de péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – fármaco.

Los ejemplos de conjugados péptido-fármaco incluyen:

un conjugado para su uso en el tratamiento de cáncer de mama en un sujeto mamífero, en el que el péptido de penetración celular se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 6, 14, 22, y 27, y el compuesto terapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste en metotrexato, ciclofosfamida, doxorubicina, 5-fluorouracilo, epirubicina, y Herceptin®;

un conjugado para su uso en el tratamiento de cáncer de ovarios o próstata en un sujeto mamífero, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia identificada en la SEQ ID NO: 23, y el compuesto terapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste en (i) un anticuerpo específico contra el antígeno de células madre

de próstata, para el tratamiento del cáncer de próstata, y (ii) taxol, doxorubicina topotecan, Herceptin® y pertuzumab, para el tratamiento del cáncer de ovarios;

un conjugado para su uso en el tratamiento de cáncer de riñón en un sujeto mamífero, en el que el péptido de penetración celular se selecciona de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, 14, 21 y 27, y el compuesto terapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste en gemcitabina y capecitabina;

un conjugado para su uso en el tratamiento de la restenosis, en el que el péptido de penetración celular se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 19 y 27, y el compuesto terapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste en rapamicina, y análogos de rapamicina que tiene actividad anti-restenosis;

un conjugado para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto mamífero, en el que el péptido de penetración celular se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 11, 14 y 19, y el compuesto terapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste en cisplatino, carboplatino, paclitaxel, y docetaxel;

Un conjugado para su uso en el tratamiento del cáncer de hígado en un sujeto mamífero, en el que el péptido de penetración celular se selecciona de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 19, 23, 24 y 25, y el compuesto terapéutico se selecciona de entre el grupo que consiste en doxorubicina, 5-fluorouracilo, y metotrexato.

Los inventores también describen en el presente documento un conjugado en el que el compuesto terapéutico es un ARNip. Dicho conjugado puede incluir, o utilizarse en conjunción con, un compuesto de unión al ARN de cadena doble al que se une el ARNip no covalentemente.

Breve descripción de las figuras

Las Figuras 1A-C muestran las estructuras ejemplares de un oligómero de morfolino unido por un fosforodiamidato (PMO), un PMO conjugado con un péptido (PPMO), y un PMO conjugado con un péptido que tiene uniones catiónicas entre subunidades (PPMO+), respectivamente. (Aunque se ilustran múltiples tipos de enlaces catiónicos en la Fig. 1C, un oligómero PMO+ o PPMO+ normalmente incluirá solo un tipo de enlace catiónico.

Las Figuras 2A-B muestran la captación celular de conjugados de distintos péptidos de penetración celular (CPP) con oligómeros de morfolino marcados con carboxifluoresceína (PMOF) en células pLuc705.

Las Figuras 3A-D muestran la actividad antisentido nuclear de conjugados PMO-vehículo peptídico en presencia o ausencia de un suero al 10 % (A-C) o en presencia de hasta un 60 % de suero (D).

La Figura 4 muestra la actividad antisentido nuclear de conjugados PMO-vehículo peptídico en función del número y posición de los restos de ácido 6-aminohexanoico (Ahx) en los péptidos.

Los péptidos 0, 2, 3a, 3b, 3c, 3d, 4a, 4b, 4c, 5 y 8, correspondientes al número de restos X en el péptido, según se muestran en la Tabla 1 como las SEQ ID NO: 14, 20, 22, 19, 21, 25, 24, 23, 26, 11 y 3, respectivamente.

Las Figuras 5A-F muestran la toxicidad relativa de los conjugados PMO-vehículo peptídico según se mide con el ensayo MTT.

Las Figuras 6A-D muestran la toxicidad relativa de los conjugados PMO-vehículo peptídico según se mide por los ensayos de exclusión de PI (A-C) y hemólisis (D).

Las Figuras 7A-P muestran la actividad de corrección de corte y empalme en distintos órganos de ratones transgénicos EGFP-654 tratados con distintos conjugados PMO-péptido de penetración celular dirigidos contra distintos EGFP-654 (SEQ ID NO: 2, 6, 11, 13, 14 y 19-27) según se mide en el diafragma (FIG. 7A), glándula mamaria (FIG. 7B), ovario y próstata (FIG. 7C), cerebro (FIG. 7D), riñón (FIG. 7E), médula ósea (FIG. 7F), colon (FIG. 7G), músculo (FIG. 7H), piel (FIG. 7I), bazo (FIG. 7J), estómago (FIG. 7K), timo (FIG. 7L), corazón (FIG. 7M), pulmones (FIG. 7N), intestino delgado (FIG. 7O), e hígado (FIG. 7P).

La Figura 8 muestra el efecto de la conjugación de un oligómero antisentido con un péptido de penetración celular específico del músculo (SEQ ID NO: 19, al que se hace referencia en el presente documento como péptido "B" y también denominado CP06062) en combinación con un péptido de asentamiento específico de músculo (MSP), según se mide por restauración de distrofina de longitud completa en el modelo de ratón MDX.

Descripción detallada

I. Definiciones

Los términos posteriores, como se utilizan en el presente documento, tienen los siguientes significados, a menos de que se indique otra cosa: Las expresiones "péptido de penetración celular" o "CPP" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a péptidos de penetración celular catiónicos también llamados péptidos de transporte, vehículos peptídicos, o dominios de transducción peptídicos. Los péptidos, como se muestran en el presente documento, tienen la capacidad de inducir la penetración celular en el 100 % de las células de una determinada población de células en cultivo y permiten la translocalización macromolecular en múltiples tejidos *in vivo* con la administración sistémica.

Las expresiones "oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" se utilizan de manera intercambiable y se refieren a una secuencia de subunidades cíclicas, que albergan cada una un resto de emparejamiento de bases, unidos por enlaces entre subunidades que permiten que los restos de emparejamiento de bases para hibridarse a una secuencia diana en un ácido nucleico (normalmente un ARN) por emparejamiento de Watson-Crick, para formar un

heterodúplex ácido nucleico: oligómero en la secuencia diana. Las subunidades cíclicas se basan en ribosa u otro azúcar pentosa o, en una realización preferida, un grupo morfolino (véase la descripción de oligómeros de morfolino posteriormente). El oligómero puede tener una secuencia exacta o casi complementaria de la secuencia diana; las variaciones en la secuencia cerca de los extremos de un oligómero se prefieren en general a las variaciones en el interior.

Dicho oligómero antisentido se diseña en general para bloquear o inhibir la traducción del ARNm o para inhibir el procesamiento natural de corte y empalme del pre-ARNm, y puede decirse que se “dirigen a” o se “direccionan contra” una secuencia diana con la que se hibrida. La secuencia diana es normalmente una región que incluye un codón de inicio ATG de un ARNm, o un sitio de corte y empalme de un ARNm pre-procesado. La secuencia diana de un sitio de corte y empalme puede incluir una secuencia de ARNm que tiene su extremo 5' 1 a aproximadamente 25 pares de bases corriente abajo de una unión receptora de corte y empalmen normal en un ARNm pre-procesado. También se pueden direccionar otros ácidos nucleicos tales como un ADN genómico, ARNr (por ejemplo, en bacterias), o secuencias necesarias para la replicación de virus.

Las expresiones “oligómero de morfolino” o “PMO” (oligómero de fosforoamidato o fosfordiamidato de morfolino) se refiere a un análogo de oligonucleótido compuesto por estructuras de subunidades de morfolino, en los que (i) las estructuras se mantienen unidas mediante enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de largo, preferentemente de dos átomos de largo, y preferentemente sin carga o catiónicos, que se unen al nitrógeno del morfolino de una subunidad de un carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente, y (ii) cada anillo de morfolino alberga un resto de emparejamiento de bases purínico o pirimidínico eficaz para la unión, por enlace de hidrógeno específico de bases, a una base de un polinucleótido. Véase, por ejemplo, la estructura de la Figura 1A, que muestra un tipo de enlace de fosfordiamidato preferido. Se pueden hacer variaciones en este enlace a condición de que no interfiera en la unión o actividad. Por ejemplo, el oxígeno unido al fósforo se puede sustituir con azufre (tiofosfordiamidato). El oxígeno 5' se puede sustituir con un amino o amino sustituido con un alquilo inferior. El nitrógeno colgante unido al fósforo puede estar no sustituido, monosustituido, o disustituido con (opcionalmente sustituido) un alquilo inferior. Véase también la exposición de los enlaces catiónicos posteriormente. El resto de emparejamiento de bases purínico o pirimidínico normalmente es adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las patentes de EE. UU. N.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063, y 5.506.337, y la Pub. PCT N.º WO 2008036127 (enlaces catiónicos).

Una “subunidad de aminoácido” o “resto de aminoácido” puede hacer referencia a un resto de α -aminoácido ((-CO-CHR-NH-)) o un resto de β -aminoácido u otros (por ejemplo, -CO-(CH₂)_nCHR-NH-), en el que R es una cadena lateral (que puede incluir un hidrógeno) y n es de 1 a 6, preferentemente de 1 a 4.

La expresión “aminoácido de origen natural” se refiere a un aminoácido presente en las proteínas que se encuentran en la naturaleza. La expresión “aminoácidos no naturales” se refiere a los aminoácidos no presentes en las proteínas que se encuentran en la naturaleza, incluyendo los ejemplos de beta-alanina (β -alanina), ácido 6-aminohexanoico (Ahx) y ácido 6-aminopentanoico.

Un “compuesto marcador” se refiere a un compuesto detectable unido a un péptido de transporte para la evaluación del transporte del conjugado resultante en una célula. El compuesto se puede detectar visual o espectrofotométricamente, por ejemplo, un compuesto fluorescente o marcado de manera fluorescente que puede incluir un oligómero marcado de manera fluorescente. Preferentemente, el compuesto marcador es un oligómero antisentido marcado o no marcado. En este caso, la detección del transporte implica la detección de un producto que resulta de la modulación del corte y empalme y/o la transcripción de un ácido nucleico por un compuesto oligómero antisentido. Los métodos ejemplares, tales como el ensayo de corrección de corte y empalme o ensayo de omisión del exón, se describen en Materiales y Métodos posteriormente.

Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de compuesto terapéutico, tal como un oligómero antisentido, administrado a un sujeto mamífero, sea como una dosis única o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado. Para un oligómero antisentido, este efecto normalmente se consigue inhibiendo la traducción o el procesamiento de corte y empalme natural de una secuencia diana seleccionada.

“Tratamiento” de un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención que se utiliza en el intento de alterar el curso natural del individuo o célula. El tratamiento incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica, y se puede llevar a cabo profilácticamente, o posteriormente al inicio de un evento patológico o contacto con un agente etiológico.

II. Características estructurales de péptidos de transporte

En general, un péptido de transporte como se describe en el presente documento es de 8 a 30 restos de aminoácido de longitud y consiste en las subsecuencia seleccionadas de entre el grupo que consiste en RXR, RX, RB, y RBR; donde R es arginina (que puede incluir D-arginina, representada en las secuencias del presente documento por R),

B es β-alanina, y cada X es independientemente -C(O)-(CHR¹)_n-NH-, donde n es 4-6 y cada R¹ es independientemente H o metilo, de manera que como mucho dos R¹ son metilos. Preferentemente, cada R¹ es hidrógeno.

- 5 En realizaciones seleccionadas, el péptido contiene al menos tres restos X y comprende una combinación de subsecuencias (RXR) y (RBR). En otras realizaciones, el péptido contiene al menos tres restos X y comprende una combinación de subsecuencias (RX) y (RB). Preferentemente, el péptido tiene de 8 a 25, y más preferentemente de 8 a 20 restos de aminoácido de longitud.
- 10 La variable n es preferentemente 4 o 5, y más preferentemente 5, por ejemplo, como en el ácido 6-aminohexanoico. A menos de que se indique otra cosa, X en las secuencias peptídicas representadas en el presente documento es un resto de ácido 6-aminohexanoico.
- 15 La Tabla 1 posterior muestra las secuencias de distintos péptidos de transporte que se evaluaron en los conjugados con oligómeros de morfolino antisentido. Los conjugados se evaluaron en cuanto a la captación celular según se determinó por citometría de flujo; actividad antisentido, según se determinó por un ensayo de corrección de corte y empalme (Kang, Cho et al. 1998); y toxicidad celular, como se determina por ensayos de viabilidad celular MTT, integridad de membrana por yoduro de propidio y hemólisis y creación de imágenes microscópicas.
- 20 Los péptidos de transporte de la Tabla 1 incluyen: secuencias de oligoarginina R8 y R9; secuencias que tiene repeticiones RXR, RX y RB (donde X es un resto de ácido 6-aminohexanoico y B es un resto de β-alanina); secuencias relacionadas que contienen D-arginina que se muestran como "r", (r)₈, (rX)₈, (rXR)₄, (rXr)₄ y (rB)₈ y secuencias que contienen una combinación de subsecuencias (RXR) o (RBR) o una combinación de subsecuencias (RX) o (RB) ("mezcla de series"). Como se ha señalado antes, normalmente se emplea un resto B o XB adicionales
- 25 como un enlace con la molécula unida.

Tabla 1. Péptidos de penetración celular ejemplares

Nombre (Denominación)	Secuencia	SEQ ID NO. ^a
Oligoargininas		
R ₈ -XB (A; 8)	RRRRRRRR-XB	3
r ₈ -XB	rrrrrrrr-XB	4
R ₉ -XB	RRRRRRRRR-XB	5
Series Oligo (RX), (RXR), y (RB), incluyendo D-arginina		
(RX) ₈ -B	RXRXRXRXRXRXR-XB	6
(rX) ₈ -B	rXrXrXrXrXrXrX-XB	7
(RX) ₇ -B	RXRXRXRXRXR-XB	8
(RX) ₅ -B	RXRXRXR-XB	9
(RX) ₃ -B	RXR-XB	10
(RXR) ₄ -XB (P007; 5)	RXRRRRXR-XB	11
(rXR) ₄ -XB	rXRrXRrXRrXR-XB	12
(rXr) ₄ -XB (D-P007)	rXrXrXrXrX-XB	13
(RB) ₈ -B (0)	RBRBRBRBRBRB-B	14
(rB) ₈ -B	rBrBrBrBrBrBrB-B	15
(RB) ₇ -B	RBRBRBRBRB-B	16
(RB) ₅ -B	RBRBRBRB-B	17
(RB) ₃ -B	RBRB-B	18
Series de mezclas de (RX), (RXR), (RB), y (RBR)		
(RXRRBR) ₂ -XB (B; 3b; CP06062)	RXRRBRXRBR-XB	19
(RXR) ₃ RBR-XB (C; 4c)	RXRRRRXRBR-XB	26
(RB) ₅ RXRBR-XB (D; 2)	RBRBRBRXRBR-XB	20

Nombre (Denominación)	Secuencia	SEQ ID NO. ^a
(RBRBRBRX) ₂ -X (E; 3c)	RBRBRBRXRBRBRBRX-X	21
X(RB) ₃ RX(RB) ₃ R-X (F; 3a)	XRBRBRBRXRBRBRBRX-X	22
(RBRX) ₄ -B (G; 4b)	RBRXRBRXRBRXRBRX-B	23
(RB) ₄ (RX) ₄ -B (H; 4a)	RBRBRBRBRXRXRBRX-B	24
RX(RB) ₂ RX(RB) ₃ R-X (I; 3d)	RXRBRBRXRBRBRBRX-X	25
(RB) ₇ RX-B	RBRBRBRBRBRBRBRX-B	27

^a Las secuencias asignadas con las SEQ ID NO. no incluyen la parte del enlace (X, B, o XB).

III. Captación celular de conjugados péptido-oligómero

5 La captación celular de los conjugados péptido-PMO, en los que el PMO era un PMO marcado con 3'-carboxi fluoresceína (PMOF), se investigó utilizando citometría de flujo. Se utilizó una concentración de tratamiento de 2 mM debido a que ninguno de los conjugados causaba una citotoxicidad detectable a esta concentración, según se demostraba por ensayos de MTT y captación PI (posteriormente). Después de la incubación con el conjugado, las células se trataron con tripsina (Richard, Melikov et al. 2003) para retirar el conjugado unido a la membrana. Para determinar el efecto del suero sobre la captación celular de distintos conjugados, se llevaron a cabo ensayos de evaluación de la captación en medio que contenía distintas concentraciones de suero.

10 Como se muestra en las Figuras 2A-B, la captación celular de los conjugados aumentaba con el número de restos de arginina en el péptido de transporte y en general disminuía con la inserción de restos X y/o B. Por ejemplo, el conjugado oligoarginina R₉-PMOF tenía un valor de fluorescencia media (MF) de 662, casi 3 veces mayor que la del R₈-PMOF. La inserción de un resto X o B en la secuencia R₈ reducía la captación de los respectivos conjugados, como se demostraba por los valores de MF para los conjugados de R_g (234), (RX)₈ (52), (RXR)₄ (70) y (RB)₈ (60) (Fig. 2A). El número de repeticiones de RX o RB también afectaba a la captación celular, teniendo los conjugados con menores repeticiones RX o RB en general valores de MF menores (Fig. 2B).

20 Aunque la adición de un 10 % de suero al menos producía una disminución de la captación de los conjugados oligoarginina R₈- o R₉-PMOF, aumentaba la captación de conjugados que contenían motivos RX, RB o RXR (Figs. 2A y 2C). Por ejemplo, la presencia de suero reducía la MF de R₉- y R₈-PMOF de 662 y 234 a 354 y 158, respectivamente, pero aumentaba la MF de (RX)₈- (RXR)₄-, (RB)₈-PMOF de 41, 70 y 60 a 92, 92 y 111, respectivamente. Estas diferencias eran estadísticamente significativas (Fig. 2A). Sin embargo, en concentraciones de suero mayores (30 % y 60 %) disminuía la captación tanto de (RXR)₄-PMOF como de oligoarginina-PMOF.

30 La estequiometría de la arginina (D vs. L) tiene poco efecto sobre la captación de los conjugados péptido-PMOF. La captación se muestra como valores MF de los conjugados R₈-, (RB)₈- y (RX)₈-PMOF no eran significativamente diferentes a sus respectivos conjugados de isómeros D, r₈- (rB)₈- y (rX)₈-PMOF (datos no mostrados).

IV. Actividad antisentido nuclear *in vitro*

35 La eficacia de los péptidos objeto en el transporte de una molécula unida al núcleo de una célula se determinó en un ensayo de corrección del corte y empalme (Kang, Cho et al. 1998), cuando el compuesto unido es un oligómero antisentido (AO) de bloqueo estérico, en este caso un PMO. Este ensayo utiliza la capacidad del oligómero para bloquear un sitio de corte y empalme creado por una mutación con el fin de restaurar un corte y empalmen normal. Específicamente la secuencia que codifica la luciferasa se interrumpe por el intrón 2 talasémico de β-globina humana, que tiene un sitio de corte y empalme mutado en el sitio del nucleótido 705. Se transfectaron células HeLa establemente con el plásmido resultante y se denominaron células pLuc705. En el sistema pLuc705, el oligómero debe estar presente en el núcleo celular si se produce la corrección del corte y empalme. Las ventajas de este sistema incluyen la lectura positiva y la alta relación señal respecto a ruido. Con este sistema se pueden comparar fácilmente las eficacias relativas de distintos péptidos de transporte para suministrar un AO con la secuencia apropiada para la corrección del corte y empalme en los núcleos celulares.

45 Como se describe posteriormente, los conjugados de péptido de transporte-PMO objeto presentan una mayor actividad en los núcleos celulares, y están menos afectados por el suero y son más estables en la sangre, que los conjugados de oligoarginina-PMO.

50 Paneles de oligoarginina, RX, RXR y RB (véase la Tabla 1). Los conjugados péptido-PMO con las mayores actividades antisentido nuclear en esta serie se descubrió que eran (RXR)₄- y (RX)₈-PMO (donde, como se ha señalado anteriormente, R es arginina, y X en estos péptidos es ácido 6-aminohexanoico). Las Figuras 3A y 3B muestran la actividad luciferasa normalizada respecto a las proteínas de las células tratadas con distintos

conjugados a 1 μM y 5 μM durante 24 h. A ambas concentraciones, (RX)₈- y (RXR)₄-PMO eran más eficaces que los otros conjugados ensayados, con una diferencia más prominente en el medio que contenía suero a 1 μM que a 5 μM . Las células tratadas con 1 μM de cualquier conjugado presentaba actividad luciferasa a un nivel de 10-15 veces por encima del de fondo, mientras que el resto de conjugados daba lugar a un aumento de 2-4 veces sobre el fondo (Figura 3A). A 5 μM todos los conjugados generaron una mayor actividad luciferasa que a 1 μM con (RX)₈-PMO y (RXR)₄-PMO de nuevo el más eficaz, seguido por el (RB)₈-PMO (Figura 3B).

La Figura 3C muestra que, a 10 μM , la actividad de los conjugados RX o RB disminuía según disminuía el número de repeticiones RX o RB (es decir, con la longitud) del péptido de transporte. Los péptidos con tres o cinco repeticiones RX o RB generaban una actividad de luciferasa mucho menor que las de siete u ocho repeticiones.

Número y posición de los restos X. Con el fin de investigar el efecto del número y posición de restos X sobre la actividad de los conjugados, se compararon once conjugados de péptido-PMO, en los que el componente peptídico contenía 0, 2, 3, 4, 5, u 8 restos X (ácido 6-aminohexanoico) (SEQ ID NO: 14, 20, 22, 19, 21, 25, 24, 23, 26, 11 y 3 como se muestra en la Tabla 1). Los datos (que se muestran como actividad de luciferasa en el ensayo descrito anteriormente) se presentan en la Figura 4.

En general, los péptidos que contienen un número mayor de restos X tenían mayores actividades de transporte. A 2 μM , (RX)₈-PMO (ocho restos X) tenía la mayor actividad, seguido por (RXR)₄-PMO (cinco restos X), y los conjugados con menor restos X tenían actividades menores.

A 5 μM , tres conjugados que contenían tres (I; SEQ ID NO: 25), cuatro (C; SEQ ID NO: 26) y ocho ((RX)₈) restos de ácido aminohexanoico tenían las actividades más altas, sugiriendo que la posición de restos X afectaba a la actividad.

Efecto del suero sobre la actividad. El efecto del suero sobre la actividad antisentido de los conjugados dependía de las secuencias peptídicas, como se muestra en las Fig. 3A-3D. La adición de un 10 % de suero al medio disminuía la actividad de los conjugados de oligoarginina-PMO (R₈-PMO y R₉-PMO) pero aumentaba la actividad de conjugados que contenían repeticiones RXR, RX y RB. La adición de un 10 % de suero casi doblaba la actividad de luciferasa de (RXR)₄-, (RX)₈-PMO a 5 μM (Figura 3B). Este efecto se investigó adicionalmente para (RXR)₄-PMO hasta con un 60 % de suero (véase la Fig. 3D). Aunque la actividad casi se doblaba según aumentaba la concentración de suero del 0 % al 10 %, disminuía según aumentaba la concentración de suero hasta el 60 %, a la cual la actividad era similar a la de un 0 % de suero (que estaba aun significativamente por encima de la de fondo). Este perfil "arriba y abajo" también se observó con el tratamiento de 1 μM de (RXR)₄-PMO. Al contrario que con (RXR)₄-PMO, la actividad de luciferasa de R₈-PMO o R₉-PMO disminuía constantemente según aumentaba la concentración de suero, con una reducción del 30 % aproximadamente con un 10 % de suero y sin actividad con el 60 % de suero (Fig. 3D). R₈-PMO o R₉-PMO no presentaban ninguna actividad detectable a 1 μM , independientemente de la concentración de suero (Fig. 3A).

V. Actividad Antisentido nuclear *in vivo*

Se conjugaron distintos péptidos de transportes con PMO, y los conjugados resultantes (P-PMO) se ensayaron en cuanto a su capacidad para transportar el PMO a distintos tejidos, de acuerdo con la invención, como se describe posteriormente en Materiales y Métodos más adelante. En resumen, se administraron los conjugados durante cuatro días consecutivos. La captación *in vivo* de los P-PMO se determinó dirigiendo el PMO (SEQ ID NO: 1) a un intrón mutado cortado empalmado aberrantemente en el gen EGRP-654 en un modelo de ratón transgénicos EGFP-654 (Sazani, Gemignani et al. 2002). En este modelo la captación celular del EGFP-654 dirigido por P-PMO se puede evaluar por detección mediante RT-PCR de un producto de corte y empalme ARNm EGFP-654 restaurado y EGFP funcionalmente restaurado en los tejidos recolectados después de la administración IP de P-PMO.

Como se muestra en las Figuras 7A-P, los P-PMO que contienen distintos péptidos de transporte presentaban una captación selectiva por los tejidos específicos. Por ejemplo, un conjugado que contenía el péptido de transporte (RXRRBR)₂-XB (SEQ ID NO: 19) presentaban captación selectiva en el corazón, músculo, pulmones, intestino delgado, colon estómago, piel y médula ósea, mientras que la captación en otros órganos estaba muy reducida en comparación. Un conjugado que contenía el péptido (RBRBRBRX)₂-X (SEQ ID NO: 21) presentaban captación selectiva en el corazón, músculo, hígado, intestino delgado, estómago y glándula mamaria, mientras que la captación en otros órganos estaba muy reducida en comparación. Un P-PMO adicional que tiene el péptido de transporte (RB)₄(RX)₄-B (SEQ ID NO: 24) presentaba captación selectiva en el colon, médula ósea, y cerebro, mientras que la captación en otros órganos estaba muy reducida en comparación. La captación tisular óptima (indicada por un *) de varios péptidos de transporte se resumen en la Tabla 2 posteriormente.

Como se muestra en el presente documento, los conjugados vehículo peptídico-PMO que son superiores a los conjugados oligoarginina-PMO en los siguientes aspectos: presentan una mayor actividad en los núcleos celulares, se afectan menos por el suero y son más estables en la sangre. La toxicidad de los vehículos peptídicos que contienen X/B se puede reducir manteniendo el número de restos X entre 3-4 mientras que se mantiene aún una

eficacia de suministro razonable y estabilidad. Una modificación adicional del contenido de X/B y orden relativo a los restos de arginina puede proporcionar el suministro específico tisular.

Tabla 2. Captación del vehículo peptídico en el tejido

Tejido (% óptimo de corrección)	Péptidos de direccionamiento al tejido óptimo: SEQ ID NO: (véase la Tabla 1)													
	19	20	21	22	23	24	25	11	13	14	27	6	3	26
Corazón (>50 %)	*									*				
Músculos de la pierna (>75 %)	*	*	*		*		*	*	*			*		
Hígado (>50 %)	*				*	*	*		*				*	
Riñón (>50 %)			*					*	*	*	*			
Pulmones (>30 %)	*							*		*				
Intest. delgado (>50 %)	*		*		*			*						
Colon (>50 %)	*	*					*	*			*			
Estómago (>30 %)	*	*	*					*			*			
Glándula mamaria (>75 %)										*	*	*		
Timo (>50 %)								*						
Bazo (>30 %)								*	*					
Ovario (>50 %)					*									
Piel (>75 %)	*							*	*					*
Médula ósea (>20 %)											*			
Cerebro (>2 %)						*			*					

5

VI. Toxicidad celular de los conjugados de vehículo peptídico-PMO

Se determinó la toxicidad celular de los distintos conjugados de vehículo peptídico-PMO por supervivencia MTT, exclusión en yoduro de propidio (PI), ensayos de hemólisis, y creación de imágenes microscópicas. Los ensayos MTT y de exclusión PI miden la actividad metabólica y la integridad de membrana de las células, respectivamente. El ensayo de hemólisis determina la compatibilidad con la sangre. Las imágenes microscópicas se utilizaron para verificar los resultados del MTT y observar la salud general de las células. Como se detalla posteriormente, los conjugados presentaban en general una baja toxicidad, teniendo los que contenían (RX)₈ y (RXR)₄ los niveles más altos de toxicidad.

10

15

Ensayo MTT (Fig. 5A-F). Se trataron célula pLuc705 con concentraciones que variaban de 2-60 µM durante 24 h. Como se muestra en la Figura 4, todos los conjugados con excepción de los que contenían (RX)₈ y (RXR)₄, no tenían toxicidad hasta los 60 µM. Los conjugados (RX)₈ y (RXR)₄ no presentaban toxicidad hasta 10 µM mientras que a concentraciones mayores reducían la viabilidad celular de una manera dependiente de la concentración, siendo el (RX)₈ más tóxico que el (RXR)₄ (Fig. 5C-D).

20

La sustitución de L-arginina con D-arginina en R₈-, (RB)₈- y (RXR)₄-PMO no cambiaba los perfiles de viabilidad de estos conjugados (Fig. 5A-C). Sorprendentemente, la sustitución L → D en (RX)₈-PMO disminuía la toxicidad (Fig. 5D).

25

Los ocho conjugados que contenían péptidos con menos de cinco restos X no inhibían la proliferación celular hasta 60 µM (Fig. 5E). Los monómeros de R o X, individualmente o en combinación, a 500 µM cada uno, no producían la inhibición de la proliferación celular (Fig. 5F).

30

Las toxicidades de los conjugados (RXR)₄-PMO, (RX(RB)₂RX(RB)₃)-PMO (péptidos de SEQ ID NO: 25) y (RXR)₃RBR-PMO (péptido de SEQ ID NO: 26) también se evaluaron en células HepG2 de hígado humano. De estos, solamente el (RXR)₄-PMO producía la inhibición dependiente de la dosis de la proliferación celular, mientras que los otros dos conjugados no tenían toxicidad hasta 60 µM, la concentración más alta en el presente estudio.

35

Imágenes microscópicas. Las imágenes de las células tratadas con 60 µM de los conjugados se correlacionaba bien con los datos de viabilidad celular MTT. Las células tratadas con (RX)₈-PMO y (RXR)₄-PMO tenían apariencia redondeada y se despegaban bien del cultivo y parecían tener menos células vivas. De manera interesante, las

células tratadas con (RX)₈-PMO parecían tener una morfología y densidad celulares normales. La sustitución de un X de (RXR)₄-PMO con un B reducía de toxicidad significativamente; es decir, las células tratadas con (RXR)₃RBR-PMO (péptido de la SEQ ID NO: 26 tenían una densidad y morfología similar a las células tratadas con el vehículo.

5 Ensayo de exclusión con yoduro de propidio. Se investigó el efecto de los conjugados sobre la integridad de las membranas celulares mediante el ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). El PI solo puede penetrar las membranas no sanas/dañadas; por lo tanto, una fluorescencia de PI positiva indica membranas celulares comprometidas. Solamente con los conjugados (RXR)₄-PMO y (RX)₈-PMO se descubrió que afectaban significativamente la integridad de la membrana a las concentraciones más altas (hasta 60 µM ensayadas).

10 La Figura 6A muestra los histogramas de las células pLuc705 tratadas con (RXR)₄-PMO a 50 µM durante 0,5, 5 y 24 h. La región positiva a PI (PI+) se definía por las células permeabilizadas con etanol (control positivo) como se indica por la puerta en el histograma. El histograma de PI cambia de la región PI-negativa a la región PI-positiva en las incubaciones más largas, indicando el conjugado causado por el goteo de membrana de una manera dependiente del tiempo. Los tratamientos de 0,5 h y 5 h producían un ligero cambio hacia la región PI+, mientras que el
15 tratamiento de 24 h producía un pico distintivo que se corresponde con un 57 % de células en la región PI+.

La Figura 6B muestra los histogramas de las células tratadas con (RXR)₄-PMO a concentraciones de 2, 10, 20, 40 y 60 µM durante 24 h. No había una captación de PI significativa a concentraciones hasta 20 µM. A concentraciones más altas, la población PI+ apareció, y el porcentaje de células PI+ aumentaba según aumentaba la concentración del tratamiento, indicando que había más células goteando a la concentración de tratamiento más alta. Se observaron perfiles de captación de PI dependientes del tiempo y concentración similares para el (RX)₈-PMO, pero no para el (RB)₈-PMO y el resto de conjugados. La adición de un 10 % de suero al medio de tratamiento reducía significativamente la toxicidad de membrana para los conjugados (RXR)₄- (Figura 6C) y (RX)₈-PMO.

25 Ensayo de hemólisis. Se ensayaron los conjugados (RXR)₄- y (RX)₈-PMO en un ensayo de hemólisis y se descubrió que eran compatibles con los glóbulos rojos de la sangre. Se trataron glóbulos rojos sanguíneos de rata recién extraídos con los conjugados a 60 µM, PBS (como fondo) o 0,005 % de TX-100 (control positivo). Los sobrenadantes de las muestras tratadas con conjugado y PBS tenían cantidades pequeñas y similares de hemoglobina libre liberada, mucho menores que la de las muestras tratadas con TX-100 (Figura 6D).

30 VII. Métodos de exploración

Como se muestra en el presente documento, los péptidos de transporte que consistían en motivos de secuencia variable que contenían arginina, incluyendo D-arginina, β-alanina, y ácido 6-aminohexanoico y homólogos son a menudo selectivos del tejido, de manera que los péptidos con secuencias diferentes proporcionan un transporte superior a diferentes tejidos seleccionados.

En consecuencia, se pueden utilizar bibliotecas de diferentes secuencias de péptido en un método para identificar un péptido de penetración celular útil para dirigir un compuesto terapéutico a un tejido de mamífero seleccionado. El
40 método comprende las etapas de:

(a) formar una biblioteca de conjugados peptídicos compuesta por:

45 (i) una pluralidad de diferentes péptidos, cada uno de 8 a 25 restos de aminoácido de longitud, y que consiste en subsecuencias seleccionadas de entre el grupo que consiste en RXR, RX, RB Y RBR; en el que R es arginina, B es (β-alanina, y cada X es independientemente -C(O)-(CHR¹)_n-NH-, donde n es 4-6 y cada R¹ es independientemente H o metilo, de manera que como mucho dos R¹ son metilos, y

(ii) un compuesto marcador acoplado covalentemente a cada péptido mediante un enlace X, B, o XB, cuya
50 concentración se puede ensayar en las células del tejido seleccionado;

(b) administrar cada conjugado peptídico a un sujeto mamario;

(c) ensayar el nivel de compuesto marcador en las células del tejido seleccionado, después de un periodo suficiente para la localización del conjugado peptídico administrado en el tejido seleccionado de un sujeto mamífero; y

55 (d) seleccionar un péptido de penetración celular útil para el direccionamiento de un compuesto terapéutico a un tejido de mamífero seleccionado, basándose en su capacidad para producir el nivel más alto o cerca del más alto de compuesto marcador, con respecto a otros péptidos de la pluralidad en el tejido seleccionado.

En algunos casos, se desea un péptido que tenga una alta actividad de transporte en una amplia variedad de tejidos. De manera alternativa, se puede desear un péptido que tenga alta actividad de transporte en un tejido particular con respecto a otros tejidos. Por lo tanto, el ensayo de la etapa (c) anterior puede comprender el ensayo del nivel del compuesto marcador en células de una pluralidad de tejidos seleccionados y la selección de la etapa (d) puede comprender la selección de un péptido de penetración celular útil para dirigir un compuesto terapéutico a un tejido seleccionado de la pluralidad, basándose en su capacidad para producir los mayores o casi mayores niveles de compuesto marcador en el tejido seleccionado, con respecto a otros péptidos en la pluralidad de péptidos, y/o con respecto a otros tejidos de la pluralidad de tejidos.

En las diferentes secuencias peptídicas, cada X es preferentemente un resto de ácido 5-aminopentanoico o, más preferentemente, un resto de ácido 6-aminohexanoico, y cada péptido contiene preferentemente al menos tres de dichos restos X. Las clases preferidas de péptidos incluyen aquellos cuya secuencia se producen por una combinación de subsecuencias (RXR) y (RBR), o una combinación de subsecuencias (RX) y (RB). En cada caso, el péptido incluye preferentemente al menos tres y más preferentemente al menos cuatro restos X.

La biblioteca puede incluir, por ejemplo, péptidos seleccionados de entre el grupo que tiene las secuencias identificadas por las SEQ ID NO: 6-27, preferentemente las SEQ ID NO: 19-27.

Normalmente, uno o dos restos de aminoácidos del extremo N seleccionados de entre el grupo que consiste en ácido 6-aminohexanoico, 5-aminopentanoico y β -alanina se emplean como un enlace del péptido al compuesto marcador.

Preferentemente, el compuesto marcador utilizado para la exploración es similar estructuralmente a la molécula terapéutica que se desea transportar en las células. El compuesto marcador y las moléculas que se van a transportar son compuestos oligoméricos antisentido, particularmente compuestos de morfolino antisentido. Un compuesto marcador oligomérico útil que se va a conjugar con los péptidos es un análogo de oligonucleótido marcado o no marcado de manera fluorescente, por ejemplo, un PMO como se describe en el presente documento. Las células de los tejidos seleccionados se pueden examinar por métodos bien conocidos para ensayar la presencia del marcador fluorescente interiorizado y por tanto determinar la extensión de la interiorización.

También se puede utilizar un ensayo de corrección de corte y empalme de ARNm que tiene una lectura visual, tal como la que se describe en Materiales y métodos posteriormente, para ensayar la interiorización nuclear. De manera alternativa, el compuesto marcador oligomérico puede ser un oligonucleótido antisentido eficaz para producir una omisión de exón en una proteína celular seleccionada, en el que la etapa de ensayo incluye el examen de productos proteicos producidos por las células de un tejido seleccionado por la presencia de la proteína celular seleccionada en una forma truncada que indica dicha omisión de exón. Una exploración ejemplar utilizando este método también se describe en Materiales y métodos posteriormente.

VIII. Aplicaciones terapéuticas ejemplares

Los péptidos que se identifican como que tienen características de suministro tisular deseables, por ejemplo, mediante los métodos de exploración descritos anteriormente, se pueden utilizar para preparar un conjugado terapéutico para su uso en el tratamiento de una afección de enfermedad asociada con un tejido seleccionado en un sujeto mamífero. En consecuencia, se identifica un péptido de transporte para un tejido seleccionado, que se selecciona por los métodos de exploración descritos anteriormente, junto con un compuesto terapéutico que es eficaz contra la afección de enfermedad cuando se localiza en las células del tejido seleccionado. El compuesto terapéutico puede conjugarse entonces con un extremo, preferentemente el extremo N, del péptido de transporte seleccionado.

Los péptidos de transporte descritos en el presente documento son particularmente útiles en aplicaciones que implican terapéuticos difícilmente solubles o escasamente transportados de otra manera. Además del uso de los vehículos peptídicos para el suministro de oligonucleótidos antisentido y sus análogos, los compuestos de la presente invención se puede utilizar para dirigir terapéuticamente moléculas útiles que de otra manera están limitadas en su capacidad para entrar en las células de tejidos diana, tal como, por ejemplo, el paclitaxel (Taxol®) y doxorubicina.

Se ha demostrado que los oligómeros de morfolino unidos por fosforodiamidato (PMO) se llevan dentro de las células y que son más efectivos constante mente *in vivo*, con menos efectos no específicos, que otros químicos de oligonucleótidos utilizados ampliamente (véase, por ejemplo, P. Iversen, "Phosphoramidate Morpholino Oligomers", en *Antisense Drug Technology*, ST. Crooke, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 2001). Sin embargo, es deseable una mejora mayor de la captación y biodistribución dirigida, y se puede conseguir, como se demuestra en el presente documento, mediante el uso de péptidos de penetración celular desvelados.

Los vehículos peptídicos y conjugados de la presente invención son particularmente útiles para el direccionamiento y suministro de un oligómero antisentido, tal como un PMO, a través de la membrana celular hacia el núcleo de tipos celulares específicos, exponiendo la célula a un conjugado que comprende el oligómero unido covalentemente a un vehículo peptídico como se ha descrito anteriormente. Dicho suministro permite el direccionamiento de sitios de corte y empalme, que se pueden implementar para la generación de proteínas con una función alterada. El sitio de inicio de la traducción (es decir, el codón de inicio AUG) es otra diana útil de la terapia antisentido, ya que son secuencias necesarias para la replicación vírica.

Los conjugados antisentido-péptido proporcionados por la presente invención son útiles en cualquier indicación en la que sea deseable el suministro a tipos celulares específicos. Las indicaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a, oligómeros antisentido que se dirigen a : enzimas P450, para la alteración del metabolismo de fármacos en

el hígado; c-myc, para el tratamiento de la enfermedad renal poliquística en el riñón, o para evitar la restenosis de las arterias coronarias en el endotelio vascular, distrofina, para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne en tejidos musculares esquelético y cardíaco; miostatina, para el tratamiento de la atrofia muscular en músculos esqueléticos; virus que producen infecciones crónicas del hígado, tal como el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis B; virus que infectan tejidos pulmonares, tal como el virus sincitial respiratorio e influenza (RSV); receptor TNF, para la generación de una isoforma soluble del receptor TNF en el hígado para inhibir la artritis inflamatoria inducida por el TNF- α ; el gen de TGF-beta en la médula ósea, para la generación de elevar a largo plazo la repoblación de células madre hematopoyéticas; y parásitos intracelulares, tales como la infección por *Plasmodium falciparum* del hígado. Las combinaciones específicas de vehículos peptídicos específicos de tejido y oligómeros antisentido para tratar las indicaciones anteriores y otras se describen posteriormente.

En otra realización, se proporciona un conjugado terapéutico para su uso en el aumento de la proliferación de células madre y su supervivencia en la sangre periférica, en el que el péptido de penetración celular tiene una secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero se dirige contra TGF- β . Como se muestra en la Fig. 7F, los péptidos ejemplares que han demostrado aumentar el transporte en la médula ósea incluye los péptidos que tienen secuencias seleccionadas de entre las SEQ ID NO: 14, 19, y 27, y preferentemente la SEQ ID NO: 27. Como se muestra en la Fig. 7L, los péptidos ejemplares que han demostrado que aumentan el transporte en el tejido del timo incluyen los péptidos que tienen las SEQ ID NO: 11, 13, 20 y 24, y preferentemente, la SEQ ID NO: 11. El compuesto terapéutico es un oligómero antisentido dirigido contra el TGF- β humano, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 44-46.

En otra realización, se proporciona un conjugado antisentido-péptido descrito en el presente documento para su uso en el tratamiento de una afección de enfermedad asociada con el tejido muscular en un sujeto mamífero. como se demuestra por los datos de la Fig. 7H, se muestra un péptido con la SEQ ID NO: 19 que aumenta el transporte en el tejido muscular incluye, y el compuesto terapéutico puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en:

(a) un oligómero antisentido dirigido contra la miostatina humana, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 35-39, para el tratamiento de una afección muscular debilitante, como se expone adicionalmente después; y

(b) un oligómero antisentido capaz de producir una omisión de exón en la proteína DMD, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 34-49, para restaurar la actividad parcial de la proteína, para tratar la distrofia muscular de Duchenne, que se expone adicionalmente después.

En otra realización, se proporciona un conjugado antisentido-péptido para su uso en una afección de enfermedad asociados con los pulmones en un sujeto mamífero. Como se muestra por los datos de la Fig. 7N, se demuestra que un péptido de SEQ ID NO: 19 aumenta el transporte al tejido pulmonar y el compuesto terapéutico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en:

un oligómero antisentido dirigido contra al ARNr 16S, tal como un PMO que tiene la SEQ ID NO: 47, para el tratamiento de infecciones respiratorias bacterianas; y

un oligómero antisentido dirigido contra el virus de la gripe A, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 41 y 42, o contra el virus respiratorio sincitial, tal como un PMO que tiene la SEQ ID NO: 48, para el tratamiento de infecciones respiratorias bacterianas, que se exponen adicionalmente después.

En otra realización, se proporciona un conjugado terapéutico para su uso en el tratamiento de una afección de enfermedad asociada con el tejido hepático de un sujeto mamífero. como se demuestra por los datos de la Fig. 7P, se muestra un péptido con la SEQ ID NO: 19 ha demostrado aumentar el transporte en el tejido hepático que incluye y el compuesto terapéutico se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en:

un oligómero antisentido dirigido contra una enzima P450, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 28-30, por la supresión del metabolismo de fármacos en el hígado, lo cual se expone adicionalmente después; y un oligómero antisentido dirigido contra el VHC, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 40 y 50, para el tratamiento de la hepatitis vírica, lo que se expone adicionalmente después.

Los inventores describen en el presente documento conjugados péptido-PMO que son superiores a los conjugados de oligoarginina-PMO por las siguientes razones: presentan una mayor actividad en los núcleos celulares, están menos afectados por el suero y son más estables en la sangre. La toxicidad de los vehículos peptídicos que contienen X/B se pueden reducir manteniendo un número de restos X entre 3-4 a la vez que se mantiene aún una eficacia de suministro y estabilidad razonables. Tras la modificación del contenido de X/B y el orden relativo respecto a los restos de arginina se puede proporcionar un mejor suministro tisular específico.

A. Aplicaciones específicas de los conjugados péptido-oligómero

(A1) Mejora de la farmacocinética de distintos fármacos después del tratamiento con oligómeros antisentido que se dirigen a CYP3A4

Se puede utilizar un vehículo peptídico para mejorar la farmacocinética de distintos fármacos en pacientes administrando un oligómero antisentido acoplado a uno o más vehículos peptídicos y que se dirigen al CYP3A4, un gen que codifica una enzima que metaboliza fármacos que reduce la semivida del fármaco. El oligómero antisentido es eficaz para reducir la producción de la enzima CYP3A4 en el sujeto, extendiendo la semivida del fármaco y la eficacia y disminución de la toxicidad de los fármacos. (Véase, por ejemplo, Pub. PCT N.º WO/2001/087286 o Pub. de Solic. de EE. UU. N.º 20040229829). Las composiciones ejemplares comprenden oligómeros antisentido de CYP3A4 acoplados a un vehículo peptídico con propiedades de suministro específicas del hígado, como se describen en la invención actual, que se dirige a la región del codón de inicio AUG del ARNm o sitios de corte y empalme en el ARN pre-procesado del gen de la CYP3A4. Vehículos peptídicos ejemplares son los péptidos B (CP06062), G, H y I (SEQ ID NO: 19 y 23-25) y oligómeros antisentido preferidos que tienen una secuencia presentada como el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 28-30.

(A2) Compuestos antisentido para el tratamiento de restenosis

Los compuestos y métodos de la presente invención son útiles en el tratamiento cardíaco en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19 y el oligómero se dirige contra c-myc. Las áreas de lesión vascular incluyen, por ejemplo, la luz vascular después de una intervención vascular, tal como la angioplastia con globo arterial coronario, con o sin la inserción de un stent. Se cree que la restenosis se produce en aproximadamente del 30 % al 60 % de las lesiones tratadas por angioplastia y aproximadamente el 20 % de lesiones tratadas con stents a los 3 a 6 meses después del procedimiento. (Véase, por ejemplo, Devi, N.B. et al., Cathet Cardiovasc Diagn 45(3):337-45, 1998). La estenosis también se puede producir después de una operación de revascularización, normalmente en segmentos de vasos sanguíneos trasplantados, y particularmente en la unión de los vasos reemplazados. La estenosis también se puede producir en las uniones anastomóticas creadas por la diálisis.

Se puede utilizar un péptido de transporte específico de tejido conjugado con un oligómero antisentido dirigido contra c-myc para reducir el riesgo de restenosis en la angioplastia transluminal, tal como a la angioplastia coronaria transluminal percutánea (PTCA) (véase, por ejemplo, la Pub. PCT N.º WO 2000/044897). En comparación con los oligómeros no conjugados con un péptido de transporte, los oligómeros conjugados presentan un suministro mejorado hacia el endotelio vascular por lo que se espera que proporcionen una eficacia mayor con dosis menores en el tratamiento de la restenosis.

Se describen en el presente documento métodos que incluyen la administración al paciente, por administración local directamente en el sitio vascular de la lesión, o por suministro sistémico mediante administración intravascular, de un oligómero anti-c-myc como se ha descrito en el presente documento, que incluye una secuencia de bases direccionada que es complementaria a una secuencia diana de al menos 12 bases contiguas en la región del sitio de inicio AUG del ARNm del c-myc humano, conjugado con un péptido de transporte con un aumento de suministro al tejido vascular, en una cantidad eficaz para reducir el riesgo de restenosis en el paciente.

Se describen en el presente documento métodos para la administración del conjugado que incluye:

- (a) poner en contacto la región del vaso con un depósito que contiene el compuesto antisentido, y la introducción del compuesto desde el depósito en el vaso por iontoforesis o electroporación;
- (b) inyectar el compuesto desde el catéter directamente en la región del vaso, bajo presión, mediante inyectoros contenidos en la superficie del globo del catéter, en el que dichos inyectoros son capaces de penetrar la túnica media del vaso.
- (c) inyectar en o en contacto con la región del vaso, micropartículas que contiene el compuesto antisentido atrapado;
- (d) poner en contacto la región del vaso con un hidrogel de revestimiento contenido en la superficie del globo del catéter y que contiene el compuesto antisentido en forma difusible; y
- (e) poner en contacto la región del vaso con un stent que tiene una capa de superficie externa que contiene el compuesto antisentido en forma difusible;
- (f) inyectar el compuesto por administración intravascular lo que resulta en un suministro sistémico de los tejidos vasculares.

El compuesto antisentido tiene preferentemente una secuencia de direccionamiento que tiene al menos un 90 % de homología con una secuencia seleccionada de entre el grupo identificado por las SEQ ID NO: 31-32.

La cantidad de compuesto antisentido administrado puede estar entre aproximadamente 0,5 y 30 mg. El compuesto se puede derivar con un resto que aumente la solubilidad del compuesto en un medio acuoso, y el compuesto se administra a partir de una solución que contiene al menos 30 mg/ml del compuesto antisentido.

El compuesto se diseña para hibridarse con el ARNm c-myc en condiciones fisiológicas con una Tm sustancialmente mayor de 37 °C, por ejemplo, al menos de 50 °C y preferentemente de 60-80 °C. El compuesto contiene preferentemente un triplete interno de 3 bases complementario del sitio AU, y bases complementarias a una o más bases 5' y 3' al sitio de inicio. Una secuencia de compuesto preferida es el 20-mero identificado como la

SEQ ID NO: 31, en la que el triplete CAT de la secuencia se une al sitio de inicio AUG, las 6 bases hacia 3' de la secuencia CAT se extiende en dirección corriente arriba (5') de la diana, y las 11 bases hacia 5' de la secuencia CAT se extiende corriente abajo de la diana.

5 El oligómero se emplea, por ejemplo, en un stent revestido, o mediante una solución de empapado *ex vivo* para el tratamiento de las venas safenas, y el suministro de otra manera en el sitio de la lesión vascular. El oligómero se puede emplear también administrando mediante un suministro sistémico en el sitio de la lesión vascular por inyección intravascular.

10 En otra realización el conjugado péptido-antisentido de la invención forma parte de una composición en particular para su uso en el tratamiento de la restenosis. Una de dichas partículas es una partícula biodegradable, por ejemplo, una partícula de polilactato o poliglicólico, que contienen el compuesto antisentido atrapado. Las partículas tienen preferentemente un intervalo de 1-5 micrómetros, y son útiles para el suministro mediante suministro directo de las partículas a un sitio de angioplastia vascular, como se describe posteriormente, bien siendo imprimidos en las paredes del vaso por presión de un globo contra la pared o por liberación a partir de una partícula portadora, tal como un stent.

20 De manera alternativa, las partículas pueden ser microburbujas que contienen el compuesto atrapado. Las partículas se pueden suministrar directamente en el sitio vascular, es decir, poniendo en contacto las paredes vasculares directamente con una suspensión de las partículas, con la liberación del compuesto de las partículas, que se puede facilitar exponiendo la región vascular a una energía ultrasónica. Se ha demostrado que las composiciones de microburbujas son particularmente útiles en el suministro de moléculas adheridas tales como oligonucleótidos, a las áreas de trombosis o lesión vascular, por ejemplo, de endotelio dañado, así como a órganos seleccionados tales como el hígado y el riñón. Véase, por ejemplo, la Pub. PCT N.º 2000/02588, Patentes de EE. UU. N.º 6.245.247 y 7.094.765, y Pub. de Solic. de EE. UU. N.º 20030207907.

25 El péptido de transporte puede conjugarse también con un compuesto antirrestenótico no antisentido, tal como rapamicina, y el conjugado se suministra de manera similar para el tratamiento de restenosis.

30 (A3) Tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

En otra realización, un oligómero antisentido conjugado a un vehículo peptídico específico del músculo como se ha descrito en el presente documento se puede utilizar en un método mejorado para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia SEQ ID NO: 19. Las mutaciones del gen de distrofina humana se pueden eliminar a partir del ARNm procesado por los oligómeros antisentido que producen la omisión de exón del exón que contienen la mutación. El ARNm de distrofina procesado resultante puede codificar una distrofina proteica funcional. Un oligómero antisentido ejemplar dirigido al exón 51 del gen de distrofina humana (SEQ ID NO: 34) induce la omisión del exón 51. Otros oligómeros antisentido adecuados incluyen los que tienen las SEQ ID NO: 49 (exón 50 humano) y 36.

40 Esta estrategia terapéutica se beneficia mucho del uso de vehículos peptídicos específicos del músculo como se ejemplifica por el péptido B (CP06062) (SEQ ID NO: 19). Como se describe posteriormente en la sección B y se ejemplifica en el Ejemplo 2, la conjugación adicional de un péptido de asentamiento específico del músculo aumenta la eficacia del oligómero aún más.

45 (A4) Tratamiento de atrofia muscular.

50 En otra realización, un oligómero antisentido como se describe en el presente documento se puede utilizar en un método para el tratamiento de la pérdida de masa muscular esquelética en un sujeto humano en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia SEQ ID NO: 19 y el oligómero antisentido se dirige contra la miostatina humana. Las etapas del método pueden implicar la medición de los niveles sanguíneos o tisulares de miostatina en el sujeto, administrando al sujeto, una cantidad inhibitoria de la expresión de miostatina de un oligómero como se ha descrito en el presente documento, conjugado con un vehículo peptídico como se describe en el presente documento, y que tiene una secuencia de bases eficaz para hibridarse con una región sensible a la expresión de la transcripción de ARN de miostatina humana procesada o preprocesada;

(a) mediante esta administración, formar con las células musculares diana del sujeto, una estructura heterodúplex de bases emparejadas compuesta por la transcripción de ARN de miostatina humana y el compuesto antisentido y que tenga una T_m de disociación de al menos 45 °C, inhibiendo de esta manera la expresión de miostatina en dichas células;

(b) en un momento seleccionado después de la administración del compuesto antisentido, medición del nivel sanguíneo o tisular de miostatina en el sujeto; y

(c) repetición de la administración, utilizando los niveles medidos en (d) para ajustar la dosis o calendario de dosificación de la cantidad de compuesto antisentido administrado, si fuera necesario, de manera que se reduzcan los niveles medidos de miostatina sobre los medidos inicialmente y mantener dichos niveles de miostatina medidos en la etapa (d) con un intervalo determinado por individuos sanos, normales.

Cuando el oligómero antisentido es eficaz para hibridarse a un sitio de corte y empalme de la transcripción de miostatina humana preprocesada, tiene una secuencia de bases que es complementaria al menos a 12 bases contiguas de un sitio de corte y empalme en una transcripción de miostatina humana preprocesada, y la formación del heterodúplex de la etapa (c) es eficaz para bloquear el procesamiento de una transcripción de miostatina preprocesada para producir una transcripción de miostatina procesada de longitud completa. Las secuencias antisentido ejemplares son las que se identifican por las SEQ ID NO: 35-39. Se ejemplifican otros vehículos peptídicos específicos del músculo por los péptidos D-P007 y (RX)₈B (SEQ ID NO: 13 y 6, respectivamente).

(A5) Tratamiento de infecciones víricas crónicas del hígado.

Una aplicación ejemplar de antivirico antisentido de la presente invención es para su uso en un método para el tratamiento de la hepatitis vírica, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia SEQ ID NO: 19 y el oligómero se dirige contra el virus de la hepatitis C o B. Los compuestos inhibidores pueden consistir en oligómeros antisentido conjugados con un vehículo peptídico específico del hígado, como se describe en el presente documento, que tiene una secuencia de bases de direccionamiento que es sustancialmente complementaria de una secuencia vírica diana que abarca el sitio de inicio AUG de la primera fase de lectura abierta del genoma vírico del VHC. La secuencia de direccionamiento es complementaria de una secuencia de al menos 12 bases contiguas del sitio de inicio AUG del VHC y regiones IRES. Las secuencias de direccionamiento ejemplares incluyen las que tienen un 90 % de homología con las SEQ ID NO: 40 y 50, respectivamente. En una realización, el oligómero es para su uso en el tratamiento de un sujeto mamífero infectado crónicamente con el virus VHC. Véase, por ejemplo, la Pub. PCT N.º WO/2005/007805 y Pub. de Solic. de EE. UU. N.º 2003224353. El vehículo peptídico específico del hígado para la conjugación con estos oligómeros antisentido se define por la SEQ ID NO: 19.

(A6) Tratamiento de la infección por virus de la gripe.

Otra clase de compuestos antiviricos antisentido ejemplares para su uso en la presente invención se utilizan en la inhibición del crecimiento de virus de la familia Orthomyxoviridae y en el tratamiento de una infección vírica. La célula huésped se pone en contacto con un oligómero antisentido conjugado con un vehículo peptídico, como se describe en el presente documento, y que contienen una secuencia de bases eficaz para hibridarse con una región diana seleccionada de entre los siguiente: i) las 25 bases del extremo 5' o 3' de un segmento de ARN vírico en sentido negativo del virus de gripe A, virus de gripe B y virus de gripe C, ii) las 30 bases terminales del extremo 3' de un ARNc en sentido positivo de virus de gripe A, virus de gripe B, y virus de gripe C, y iii) las 40 bases que rodean el codón de inicio ATG de un ARNm vírico de gripe. (Véase, por ejemplo, la Pub. PCT N.º WO/2006/047683 o Pub. de Solic. de EE. UU. N.º 20070004661).

Los compuestos son particularmente útiles en el tratamiento de la infección por virus de gripe en un mamífero. El conjugado vehículo peptídico-oligómero se puede administrar a un sujeto mamífero infectado con el virus de gripe, o en riesgo de infección con el virus de gripe.

Los oligómeros antisentido ejemplares que se dirigen al virus de gripe A se enumeran como las SEQ ID NO: 41 y 42. Estas secuencias se dirigirán a la mayoría, si no todas, las cepas de virus de gripe A debido al alto grado de homología entre las cepas en las dianas respectivas. El vehículo peptídico específico del pulmón para la conjugación con estos oligómeros antisentido son el péptido B (CP06062), (SEQ ID NO: 19).

(A7) Inhibición de artritis inflamatoria inducida por TNF- α .

En otra realización, se puede alterar la expresión del receptor de TNF (TNF2) con oligómeros antisentido de morfolino con fosforodiamidato conjugados con un vehículo peptídico específico del hígado, como se describe en el presente documento, para inducir la expresión de una isoforma 2 del receptor de TNF- α soluble alternativamente cortada y empalmada (sTNFR2). Esta isoforma cortada y empalmada alternativamente de origen natural del gen TNFR2 proporciona propiedades antiinflamatorias debido a que antagoniza con la actividad biológica del TNF- α . La sobreexpresión de la isoforma sTNFR2 utilizando oligómero antisentido conjugados con vehículos peptídicos específicos del hígado y dirigidos hacia la región del exón 7 receptora del corte y empalme del gen TNFR2 humano (por ejemplo, la SEQ ID NO: 33) proporciona una estrategia inmunoterapéutica para inhibir la artritis inflamatoria, específicamente la artritis inducida por el TNF- α . El vehículo proteico es el B (CP06062), (SEQ ID NO: 19).

(A8) Modulación de la función inmunorreguladora, que incluye el tratamiento de trastornos del sistema inmunitario

Se había descrito el uso de oligómeros antisentido para el tratamiento de distintas afecciones relacionadas con la inmunidad. Por ejemplo, la administración de un oligómero antisentido que abarca la unión de corte y empalme entre el intrón 1 y el exón 2 de ARNm preprocesado del antígeno-4 de linfocitos T (CTLA-4) daba como resultado un aumento de la relación de ARNm preprocesado que codifica el CTLA-4 independiente de ligando respecto al ARNm procesado que codifica el CTLA-4 de longitud completa, que es útil para suprimir una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero, por ejemplo, para el tratamiento o prevención de una afección autoinmunitaria o rechazo de trasplantes. Véase la Pub. de Solic. de copropiedad de EE. UU. N.º 20070111962.

En otras realizaciones, el oligómero antisentido dirigido contra cFLIP produce la activación de la muerte celular inducida (AICD) de los linfocitos activados, como se describen en la Pub. de Solic. de copropiedad de EE. UU. N.º 20050203041. El antisentido dirigido contra IL-10 es eficaz para invertir la inmunosupresión inducida por IL-10, como se describe en la Solicitud provisional copropiedad USSN 60/009.464.

La eficacia de cualquiera de estos oligómeros puede aumentarse por la conjugación de un péptido que tiene la secuencia representada por SEQ ID NO: 27, que es selectiva para el suministro en la médula ósea.

B. Combinación con péptidos de asentamiento

Los péptidos de penetración celular (CPP) de la invención se pueden utilizar en conjunción con péptidos de asentamiento selectivos del tejido diana, para aumentar más el suministro específico del tejido. El aislamiento de péptidos de asentamiento de órganos se puede conseguir utilizando una variedad de técnicas, incluyendo bibliotecas de combinaciones de fagos de presentación, como describe Kolonin et al. (Kolonin, Sun et al. 2006). Las técnicas del aislamiento de péptidos de asentamiento de órganos también se describen por los mismos investigadores en la Pub. de Solic. de EE. UU. N.º 20040170955 y por Vodyanoy et al. en la Pub. de Solic. de EE. UU. N.º 20030640466. Estos péptidos de asentamiento se unen a receptores específicos del tejido basados en la similitud del péptido seleccionado al ligando natural del receptor.

Un ejemplo de la utilidad de esta estrategia se puede encontrar en la aplicación de péptidos de unión al músculo (Samoylova y Smith, 1999; Vodyanoy et al., Pub. de Solic. de EE. UU. N.º 20030640466) acoplados a oligómeros antisentido diseñados para ser tratamientos terapéuticos de la distrofia muscular de Duchenne (DMD) (Gebbski, Mann et al. 2003; Alter, Lou et al. 2006) (Pub PCT N.º WO2006000057). La secuencia heptapeptídica ASSLNIA tiene propiedades de unión mayores al músculo esquelético y cardíaco *in vivo*, como describen Samoylova y Smith. Como ejemplo adicional, un péptido de asentamiento en el páncreas, CRVAS-VLPC, imita el ligando del receptor de prolactina natural (Kolonin, Sun et al. 2006).

Acoplando los péptidos de asentamiento específicos de tejido con los péptidos de penetración celular de la presente invención se proporciona un aumento del suministro específico del tejido de oligómeros antisentido PMO. Una molécula peptídica dual ejemplar tiene un péptido de penetración celular en un extremo, por ejemplo, en el extremo 5' del oligómero antisentido, como se describe en el presente documento, y un péptido de asentamiento acoplado en el otro extremo, es decir, el extremo 3'. El péptido de asentamiento localiza el PMO conjugado con el péptido en el tejido diana, donde el resto peptídico de penetración celular efectúa el transporte en las células del tejido.

De manera alternativa, una molécula peptídica dual ejemplar preferida tendría ambos péptidos de asentamiento (HP) y péptido de penetración celular (CPP) conjugados en un extremo, por ejemplo, el extremo 5' del oligómero antisentido, en sea una configuración HP-CPP-PMO o, más preferentemente, una configuración CPP-HP-PMO.

Por ejemplo, un PMO diseñado para inducir una omisión de exón del gen de distrofina, como se describe por Wilton et al. (Publicación PCT WO2006/000057), conjugado en el extremo 3' con el péptido de unión al músculo ASSLNIA, y acoplado adicionalmente en el extremo 5' con un péptido de penetración celular de la presente invención, preferentemente que tenga una selectividad aumentada por el tejido muscular, proporcionará un mayor potencial terapéutico en el tratamiento de la DMD. Esto se ejemplifica en el Ejemplo 2, posteriormente.

De manera similar, el péptido de asentamiento específico del páncreas descrito anteriormente, CRVASVLPC, se podría acoplar con el extremo 3' de un PMO, y un CPP de la presente invención, preferentemente que tenga una selectividad aumentada por la pancreasa, se podría acoplar con el extremo 5'. El péptido de asentamiento pancreático localizaría el conjugado en el páncreas, y el CPP suministraría entonces el conjugado internamente en las células del páncreas. De manera alternativa, y preferentemente, tanto el péptido de asentamiento específico del páncreas y el CPP se podrían acoplar al extremo 5' del oligómero antisentido, en una configuración HP-CPP-PMO o CPP-HP-PMO.

Ejemplos de péptidos de asentamiento conocidos en la técnica se enumeran a continuación en la Tabla 2 junto con sus tejidos diana. Cualquiera de estos péptidos de asentamiento se puede acoplar con un CPP específico de tejido apropiado de la presente invención para aumentar más el suministro específico de tejido de los oligómeros antisentido.

Tabla 3. Ejemplos de péptidos de asentamiento específicos de tejido (HP)

Tejido diana	Secuencia peptídica (de NH ₂ a COOH)	SEQ ID NO.
Músculo esquelético - SMP 1	ASSLNIA	51
SMP2	SLGSFP	52
SMP3	SGASAV	53
SMP4	GRSGAR	54

Tejido diana	Secuencia peptídica (de NH ₂ a COOH)	SEQ ID NO.
SMP5	TARGEHKEEELI	55
Músculo cardíaco - CMP1	WLSEAGPWTVRALRGTGSW	56
CMP2	VTVRALRGTSW	57
CMP3	WTVRALRGTGSW	58
CMP4	CRPPR	59
CMP5	SKTFNTHPQSTP	60
Pulmón	CGFECVRQCPCRC	61
Próstata	SMAIARL	62
Cerebro	CLSSRLDAC	63
Células madre hematopoyéticas	STFTKSP	64
Piel	CVALCREACGEGC	65
Páncreas - Panel	SWCEPGWCR	66
Panc2	CRVASVLPC	67
Panc3	LSGTPERSGQAVKVKLKAIP	68
Intestino	YSGKWGW	69
Tumor de vejiga	CSNRDARRC	70
Tumor de mama	Péptido cíclico cCPGPEGAGC (PEGA)	71
Células dendríticas	FYPSYHSTPQRP	72
Tumor	CGKRK	73
Tumores vasculares	KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKKAPAK K	74
Tumores endoteliales	CGNKRTRGC	75
Hepatocitos	FQHPSFI	76

C. Suministro de ARNip

5 El CPP de la presente invención también se puede utilizar para suministrar moléculas de ARNip. Se sabe en la técnica que la introducción de dúplex de ARN de interferencia pequeño (ARNip) en el citoplasma de células de mamífero desencadena un proceso evolutivo conservado que cataliza la regulación negativa específica de dianas ARNm mediante complementación de oligonucleótido de ARNip y escisión de ARNm (Sontheimer 2005). El potencial para ARNip en el tratamiento de múltiples estados de enfermedad se ha convertido en el foco de un gran número de laboratorios académicos y compañías farmacéuticas por todo el mundo (Behlke 2006). Existe un potencial significativo para los CPP de la presente invención para suministrar ARNip, rodeando de esta manera las múltiples complicaciones *in vivo* que presentan las metodologías que se utilizan actualmente para el suministro de ácidos nucleicos.

15 Sin embargo, con el fin de neutralizar las cargas catiónicas de los CPP (que se cree que tiene un papel significativo en la interiorización celular), se prefiere el empleo de proteínas de unión al ARNs (DRBP). Los DRBP se unen a los ARNip de una manera dependiente de la secuencia y proporciona un medio para enmascarar la carga negativa de los oligonucleótidos ARNip, permitiendo de esta manera el suministro de ARNip mediado por CPP.

20 IX. Composiciones de conjugado péptido-oligómero antisentido

A. Conjugados para aplicaciones específicas

25 Se describen en el presente documento conjugados terapéuticos que comprenden secuencias de péptidos de transporte seleccionadas. Estos incluyen los conjugados que comprenden un vehículo peptídico como se describe en el presente documento, preferentemente seleccionados de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, 21, 23, 24, 25, y 27, conjugadas, por el extremo del péptido, a un compuesto terapéutico, en el que el compuesto es un

análogo de ácido nucleico, tal como un PMO; o un compuesto no ácido nucleico, tal como un compuesto orgánico pequeño.

5 Los conjugados pueden comprender adicionalmente un resto de direccionamiento eficaz para unirse a receptores específicos de tejido de un tejido tipo diana, unido al compuesto terapéutico o, preferentemente, a otro extremo del vehículo peptídico. Un péptido de asentamiento tal como el que se ha descrito anteriormente se conjuga a un compuesto terapéutico o al péptido de penetración celular en algunos conjugados descritos en el presente documento.

10 De particular interés son los conjugados específicos que se describen posteriormente.

Los inventores describen en el presente documento un conjugado para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata en un sujeto mamífero, que comprende un vehículo peptídico que tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO: 23, y conjugado con un extremo del péptido, un oligómero antisentido dirigido contra el receptor proteico del andrógeno humano, tal como un PMO que tiene la SEQ ID NO: 43.

15 Los inventores también describen en el presente documento un compuesto conjugado con un péptido para su uso en el tratamiento de la enfermedad renal poliquística en un sujeto mamífero que comprende un vehículo peptídico que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 13, 14, 21, y 27, y particularmente, la SEQ ID NO: 13; y conjugado con un extremo del péptido, un oligómero antisentido dirigido contra la proteína c-myc humana, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 31-33.

20 La invención proporciona un compuesto conjugado con un péptido para aumentar la proliferación y supervivencia de células madre en sangre periférica que comprende un vehículo peptídico que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 19, y conjugado a un extremo del péptido, un oligómero antisentido contra el TGF- β humano; tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 44-46.

25 También se proporciona un compuesto conjugado con un péptido para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, que comprende un vehículo peptídico que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 19, y conjugado con un extremo del péptido, un oligonucleótido antisentido capaz de producir una omisión de exón en la proteína DMD, tal como un PMO que tiene la SEQ ID NO: 44, para restaurar la actividad parcial de la proteína DMD.

30 También se proporciona un compuesto conjugado con un péptido para su uso en el tratamiento de la restenosis cardíaca, que comprende un vehículo peptídico de SEQ ID NO: 19, conjugado con un extremo del péptido, un oligómero antisentido dirigido contra el c-myc humano, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 31-33.

35 Los inventores describen en el presente documento un compuesto conjugado con un péptido para su uso en el tratamiento de una infección vírica respiratoria, que comprende un vehículo peptídico que tiene la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 10, y conjugado con un extremo del péptido, un oligómero antisentido dirigido contra el virus de gripe A, tal como un PMO que tiene una secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 41 y 42, o contra el virus sincitial respiratorio, tal como un PMO que tiene una secuencia identificada por la SEQ ID NO: 48.

40 También se proporciona un compuesto conjugado con un péptido para su uso en el tratamiento de una infección respiratoria bacteriana, que comprende un vehículo peptídico que tiene la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 19, y conjugado con un extremo del péptido, un oligómero antisentido dirigido contra un ARNr 16S bacteriano, tal como un PMO que tiene la SEQ ID NO: 47.

45 También se proporciona un compuesto conjugado con un péptido para su uso en la redirección metabólica de un compuesto xenobiótico metabolizado normalmente en el hígado, que comprende un vehículo peptídico que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 19, y conjugado con un extremo del péptido, un oligómero antisentido dirigido contra la enzima P450, tal como un PMO que tiene la secuencia seleccionada de entre las SEQ ID NO: 28-30.

50 También se proporciona un compuesto conjugado con un péptido para su uso en el tratamiento de la hepatitis vírica, que comprende un vehículo peptídico que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 19, y conjugado con un extremo del péptido, un oligómero antisentido dirigido contra el virus de la hepatitis C o el virus de la hepatitis B o la región de inicio o IRES del VHC, tal como un PMO que tiene la SEQ ID NO: 39 o 40.

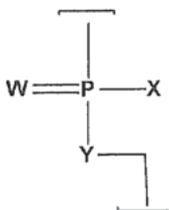
60 B. Oligómeros de morfolino que tienen enlaces catiónicos entre subunidades

El oligómero antisentido es un oligonucleótido morfolino con fosforodiamidato (PMO). El PMO puede incluir entre un 20-50 % de enlaces de armazón cargados positivamente, como se describe posteriormente, y adicionalmente en la Pub. PCT N.º WO 2008036127.

65 Los PMO catiónicos (PMO+) son oligómeros de morfolino en los que al menos un enlace entre las subunidades de dos estructuras de anillo de morfolino consecutivas contienen un grupo catiónico colgante. El grupo colgante alberga

un átomo de nitrógeno distal que puede tener una carga positiva a un pH neutro o casi neutro (por ejemplo, fisiológico). Se muestran ejemplos en las Fig. 1B-C.

Los enlaces entre subunidades en estos oligómeros son preferentemente enlaces que contienen fósforo, que tienen la estructura:



donde

W es S u O, y preferentemente es O,

X = NR¹R² u OR⁶,

Y = O o NR⁷,

y cada dicho enlace del oligómero se selecciona de entre:

(a) enlace sin carga (a), donde cada R¹, R², R⁶ y R⁷ se selecciona independientemente de entre hidrógeno y un alquilo inferior;

(b1) enlace catiónico 1 (b1), donde X = NR¹R² e Y = O, y NR¹R² representa un grupo piperazino opcionalmente sustituido, de manera que R¹R² = - CHRCHRⁿ(R³) (R⁴) CHRCHRⁿ-, donde

cada R es independientemente H o CH₃,

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

R³ se selecciona de entre H, un alquilo inferior, por ejemplo, CH₃, C(=NH)NH₂, Z-L-NHC(=NH)NH₂, y {C(O)CHR'NH_mH}, donde: Z es C(O) o un enlace directo, L es un enlazador opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente hasta de 8 átomos de longitud, que tiene enlaces seleccionados de entre alquilo, alcoxi, y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es 1 a 6, preferentemente 1 a 4;

(b2) enlace catiónico (b2), donde X = NR¹R² e Y = O, R¹ = H o CH₃, y R² = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³, y R⁴ son como se ha definido anteriormente, y R⁵ es H, un alquilo inferior, o un (alcoxi)alquilo inferior; y

(b3) enlace catiónico (b3), donde Y = NR⁷ y X = OR⁶, y R⁷ = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³, R⁴ y R⁵ son como se ha definido anteriormente, y R⁶ es H o un alquilo inferior;

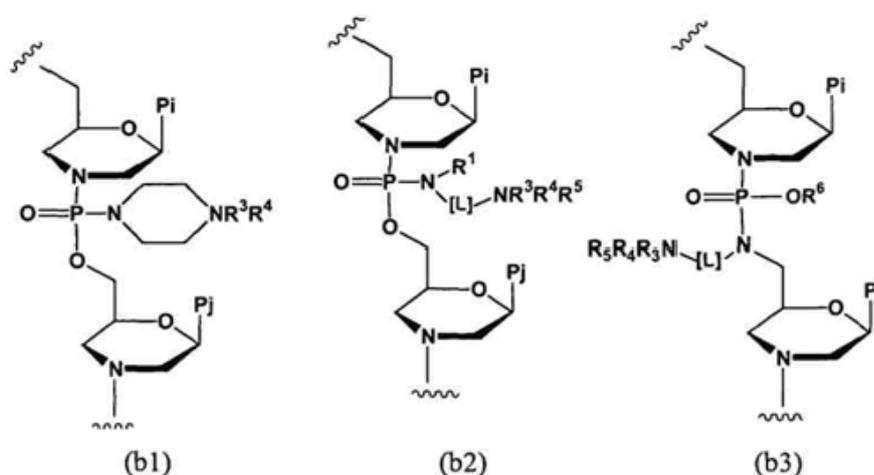
y al menos uno de dichos enlaces se selecciona de entre los enlaces catiónicos (b1), (b2), y (b3).

Preferentemente, el oligómero incluye al menos dos enlaces consecutivos de tipo (a) (es decir, enlaces sin carga). En realizaciones adicionales, al menos un 5 % de los enlaces del oligómero son enlaces catiónicos (es decir, de tipo (b1), (b2), o (b3)); por ejemplo, de un 10 % a un 80 %, de un 10 % a un 50 %, o de un 10 % a un 35 % de los enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

En una realización, al menos un enlace es de tipo (b1), donde, preferentemente, cada R es H, CH₃, o un par de electrones, y R³ se selecciona de entre H, un alquilo inferior, por ejemplo, CH₃, C(=NH) NH₂, y C(O)-L-NHC(=NH) NH₂. Las dos últimas realizaciones de R³ proporcionan un resto guanidina, sea unido directamente al anillo de piperazina, o colgante a un grupo enlazador L, respectivamente. Por facilidad de síntesis, la variable Z en R³ es preferentemente C(O) (carbonilo), como se muestra.

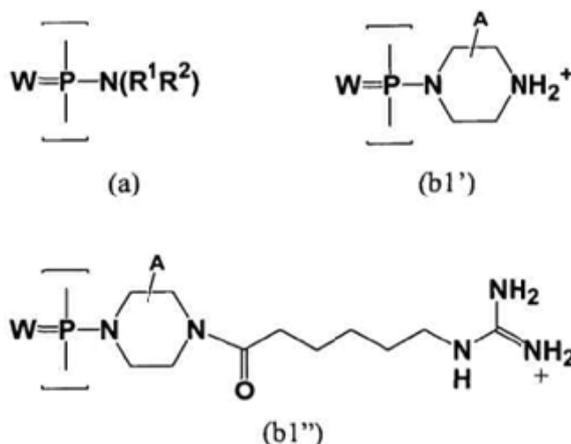
El grupo enlazador L, como se señala anteriormente, contiene enlaces en su armazón seleccionados de entre alquilo (por ejemplo, -CH₂-CH₂-) alcoxi (-C-O-), y alquilamino (por ejemplo, -CH₂-NH-), a condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes al carbonilo o nitrógeno) son átomos de carbono. Aunque los enlaces ramificados (por ejemplo, -CH₂-CHCH₃-) son posibles, el enlazador preferentemente no está ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador hidrocarbonado. Dicho enlazador puede tener la estructura -(CH₂)_n-, donde n es 1-12, preferentemente 2-8, y más preferentemente 2-6.

El uso de las realizaciones de tipos de enlaces (b1), (b2) y (b3) anteriores que unen las subunidades de morfolino pueden ilustrarse gráficamente de la siguiente manera:



5 Preferentemente, todos los enlaces catiónicos del oligómero son del mismo tipo; es decir, todos del tipo (b1), todos del tipo (b2), o todos del tipo (b3). Los restos de emparejamiento de bases Pi pueden ser el mismo o diferentes, y generalmente se diseñan para proporcionar una secuencia que se une a un ácido nucleico diana.

10 En realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos se seleccionan de entre los enlaces (b1') y (b1'') como se muestra posteriormente, donde se hace referencia a (b1') en el presente documento como un enlace "Pip" y se hace referencia a (b1'') en el presente documento como enlace "GuX":



15 En las estructuras anteriores, W es S u O, y preferentemente O; cada R¹ y R² se selecciona independientemente de entre hidrógeno y alquilo inferior, y es preferentemente metilo; y A representa hidrógeno o un sustituyente no interferente sobre uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferentemente, los anillos de carbono en el anillo de piperazina no están sustituidos; sin embargo, pueden incluir sustituyentes no interferentes, tales como metilo o fluoro. Preferentemente, al menos uno o dos átomos de carbono están sustituidos así.

20 En realizaciones adicionales, al menos un 10 % de los enlaces son del tipo (b1') o (b1''); por ejemplo, de un 20 % a un 80 %, de un 20 % a un 50 %, o de un 20 % a un 30 % de los enlaces pueden ser del tipo (b1') o (b1'').

En otras realizaciones, el oligómero contiene enlaces no del tipo (b1') anterior. De manera alternativa, el oligómero contiene enlaces no del tipo (b1) en los que cada R es H, R³ es H o CH₃, y R⁴ es H, CH₃ o un par de electrones.

25 Los oligómeros que tiene cualquier número de enlaces catiónicos se pueden utilizar, incluyendo oligómeros unidos completamente catiónicos. preferentemente, sin embargo, los oligómeros están cargados parcialmente, que tienen, pero ejemplo, un 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de enlaces catiónicos. En realizaciones seleccionadas, aproximadamente de un 10 a un 80, de un 20 a un 80, de un 20 a un 60, de un 20 a un 50, de un 20 a un 40, o aproximadamente de un 20 a un 35 por ciento de los enlaces son catiónicos.

30 En una realización, los enlaces catiónicos se intercalan a lo largo del armazón. Los oligómeros parcialmente cargados contienen preferentemente al menos dos enlaces sin carga consecutivos; es decir, el oligómero preferentemente no tiene un patrón estrictamente alternante a lo largo de la longitud completa.

35

También se consideran oligómeros que tienen bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces sin carga; por ejemplo, un bloque central de enlaces sin carga puede estar flanqueado por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene aproximadamente la misma longitud de las regiones 5', 3' y del centro, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región del centro es mayor de aproximadamente el 50 %, preferentemente mayor de aproximadamente el 70 %.

Los oligómeros para su uso en las aplicaciones antisentido en general varían de longitud desde aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades, más preferentemente de aproximadamente 15 a 25 subunidades. Por ejemplo, en un oligómero catiónico que tiene 19-20 subunidades, una longitud útil para el oligómero antisentido, puede ser idealmente de dos a siete, por ejemplo, de cuatro a seis, o de tres a cinco enlaces catiónicos, y el resto son enlaces sin carga. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades puede tener idealmente de dos a cinco, por ejemplo, 3 o 4 enlaces catiónicos y el resto son enlaces sin carga.

Cada estructura en anillo de morfolino soporta un resto de emparejamiento de bases, para formar una secuencia de restos de emparejamiento de bases que normalmente se diseña para que se hibride con una diana antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto que se va a tratar. El resto de emparejamiento de bases puede ser una purina o pirimidina que se encuentra en un ADN o ARN nativo (A, G, C, T, o U) o un análogo, tal como hipoxantina (la base componente del nucleósido inosina) o 5-metil citosina.

Como se ha señalado anteriormente, el oligonucleótido sustancialmente sin carga se puede modificar para incluir uno o más enlaces cargados, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 cada 2-5 enlaces sin carga, normalmente 3-5 por cada 10 enlaces sin carga. La mejora óptima en la actividad antisentido se ve cuando hasta aproximadamente la mitad de los enlaces del armazón son catiónicos. Algo, pero no la mejora máxima se ve normalmente con un número pequeño, por ejemplo, un 10-20 % de enlaces catiónicos; en el que el número de enlaces catiónicos excede el 50-60 %, la especificidad de secuencia de la unión antisentido con su diana puede comprometerse o perderse.

La mejora que se ve con cargas catiónicas añadidas al armazón puede ser, en algunos casos, aumentarse más distribuyendo el grueso de las cargas más cerca de la "región central" de los enlaces del armazón del oligonucleótido antisentido, por ejemplo, en un oligonucleótido 20-merico con 8 enlaces catiónicos del armazón, que tenga un 70-100 % de estos enlaces cargados localizados en los 10 enlaces más centrales.

C. Otros tipos de oligómeros

El suministro de químicas antisentido alternativas también se pueden beneficiar del vehículo peptídico desvelado. Ejemplos específicos de otros compuestos antisentido incluyen los que al menos uno, o todos, los restos de fosfato entre nucleótidos son fosfatos modificados, tal como metilfosfonatos, fosforotioatos, o fosforoamidatos. Otras moléculas incluyen las que al menos, o todos, los nucleótidos contienen un resto alquil inferior 2' (por ejemplo, C1-C4, alquilo lineal o ramificado, saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo, o isopropilo).

En otros oligonucleótidos miméticos, tanto el azúcar como el enlace internucleósido, es decir, el armazón, de las unidades de nucleótido están modificados. Las unidades de bases se mantienen para la hibridación con un compuesto dirigido al ácido nucleico apropiado. Uno de dichos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que se ha demostrado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se hace referencia como un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, el armazón de azúcar-fosfato de un oligonucleótido se reemplaza con un armazón que contienen amida, en particular un armazón de aminoetilglicina.

Los oligonucleótidos se pueden clasificar como "quiméricos", por ejemplo, que contienen al menos una región en la que se modifica el oligonucleótido de manera que confieren un aumento de resistencia a la degradación por nucleasas o aumento de captación celular, y una región adicional para el aumento de la afinidad de unión con un ácido nucleico diana.

Ejemplos

Materiales y métodos

Ensayos in vitro e in vivo

Ensayo de actividad nuclear. Se determinó la eficacia de cada conjugado P-PMO en un ensayo de corrección de corte y empalme para evaluar la actividad nuclear que utiliza un P-PMO dirigido al sitio de corte y empalme en un plásmido creado por una interrupción en la secuencia codificante de la luciferasa por el intrón 2 talasémico de β -globina humano que alberga un sitio de corte y empalme mutado en el nucleótido 705 (pLuc705). El plásmido se transfectar establemente en células HeLaS3, que permite la comparación fácil de la eficacia relativa de distritos vehículos peptídicos para suministrar PMO (705; 5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA-3'; SEQ ID NO: 1) capaz de restaurar la corrección de corte y empalme en los núcleos celulares. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, y un 10 % de suero bovino fetal (FBS) a 37 °C en

una atmósfera humidificada que contenía un 5 % de CO₂, y se sembraron durante 20 horas antes del tratamiento con 2 µM de P-PMO. Todos los tratamientos celulares con P-PMO se llevaron a cabo en medio OptiMEM con o sin FBS durante 24 horas. Después del tratamiento celular, se midió la restauración de la corrección de corte y empalme correcta por lectura positiva de la expresión de luciferasa en lisados celulares sobre un lector de luminiscencia-fluorescencia de microplacas Flx 700 con excitación a 485 nm y emisión a 524 nm.

Ensayo de captación celular. Se determinó a captación celular de P-PMO en células HeLa pLuc705 utilizando P-PMO marcado con 3'-carboxifluoresceína (P-PMOF) y citometría de flujo. Se sembraron las células durante 20 horas antes del tratamiento con 2 µM de P-PMOF. Después del tratamiento, se tripsinizaron las células para eliminar cualquier P-PMOF unido a la membrana celular, y se lavó y suspendió en PBS (Hyclone, Ogden, UT) que contenía un 1 % de FBS y un 0,2 % de NaN₃. La captación de P-PMOF se determinó entonces por citometría de flujo en un citómetro FC-500 de Beckman Coulter (Fullerton, CA) y se procesaron los datos utilizando el software FCS Express 2 (De Novo Software, Thornhill, Ontario, Canadá).

Extracción de ARN. El ARN tisular se extrajo utilizando el Mini Kit RNeasy de Qiagen (Qiagen USA, Valencia, CA) según el protocolo del fabricante. Todo el ARN aislado se almacenó a -80 °C.

RT-PCR. Se determinó la restauración de la corrección de corte y empalme por amplificación en RT-PCR de ARNm de EGFP extraído de los tejidos recolectados de ratones transgénicos EGFP-654 tratados con P-PMO utilizando el Sistema RT-PCR en una etapa SuperScript™ III de Invitrogen.

Ensayos de toxicidad

La toxicidad celular de P-PMO se determinó por supervivencia con metiltiazoltetrazolio (MTT), exclusión en yoduro de propidio, y ensayos de hemólisis, que medían los efectos de los P-PMO sobre la actividad metabólica, integridad de membrana, y compatibilidad con glóbulos rojos sanguíneos, respectivamente.

Análisis MTT. Para el análisis MTT, las células se sembraron a una concentración de 9000 células/pocillo en placas de 96 pocillos durante 20 horas tratadas entonces con P-PMO variando su concentración de 2-60 µM. La solución MTT se añadió entonces a las células durante 4 horas y se midió la actividad metabólica leyendo la absorbancia del medio de tratamiento y normalizando la absorbancia de las muestras tratadas con P-PMO a la absorbancia media de las muestras no tratadas. Se visualizaron las imágenes microscópicas de células tratadas con P-PMO en un microscopio invertido Nikon Diaphot (Melville, NY) y se procesaron con software Magnafire (Optronics, Goleta, CA) para la correlación con los resultados de MTT. Todos los ensayos se hicieron utilizando células HeLa pLuc705. Las imágenes de las células tratadas con P-PMO se visualizaron en un microscopio invertido Nikon Diaphot (Melville, NY) y se procesaron con software Magnafire (Optronics, Goleta, CA) para la correlación con los resultados de MTT. Todos los ensayos se hicieron utilizando células HeLa pLuc705.

Exclusión por yoduro de propidio. Para los análisis de exclusión por PI, se sembraron las células a una concentración de 100.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos durante 20 horas se trataron entonces con P-PMO variando la concentración de 2-60 µM. Las células se tripsinizaron, se lavaron en PBS, y se resuspendieron en PBS que contenía PI durante 15 minutos. La detección de membranas no sanas o dañadas se hizo analizando la captación de PI por las células por citometría de flujo.

Compatibilidad de glóbulos rojos sanguíneos. Se determinaron las actividades hemolíticas en los glóbulos rojos expuestos a P-PMO variando la concentración de 2-60 µM utilizando sangre de rata recién extraída de acuerdo con un método establecido (Fischer, LI et al., 2003).

Experimentos en Ratón MDX. Se llevaron a cabo los experimentos utilizando la cepa MDX de ratón esencialmente como describe Jearawiriyapaisam, Moulton et al., 2008.

Ejemplo 1. Evaluación del péptido de penetración celular conjugado con PMO en el modelo de ratón transgénico EGFP-654

Se conjugó un PMO (denominado 654; 5'-GCT ATT ACC TTA ACC CAG-3'; SEQ ID NO: 2) diseñado para restaurar el corte y empalme correcto en el gen de la proteína verde fluorescente aumentada (EGFP) con distintos péptidos de penetración celular (SEQ ID NO: 2, 3, 6, 11, 13-14, 19, 20-27) para producir P-PMO (PMO conjugados con péptidos), que se evaluaron *in vivo* en cuanto a su actividad de corrección del corte y empalme y toxicidad en el modelo de ratón transgénico EGFP-654 (Sazani, Gemignani et al. 2002). En este modelo, el gen EGFP-654 que codifica una EGFP funcional se interrumpe por un intrón de corte y empalme mutado aberrantemente, y se puede evaluar la captación celular de P-PMO dirigidos contra EGFP-654 por detección mediante RT-PCR del producto de corte y empalme EGFP-654 restaurado en los tejidos.

Se les inyectó a ratones transgénicos EGFP-654 hembras por vía IP una vez al día durante 4 días consecutivos con solución salina o una dosis de 12,5 mg/kg de P-PMO. Después del tratamiento el día 4, se recolectaron el corazón, músculos, el hígado, riñón, pulmones, intestino delgado, colon, estómago, glándula mamaria, timo, bazo, ovario, piel,

médula ósea y cerebro y el ARN extraído se evaluó por RT-PCR y la densitometría de los productos de la PCR para determinar el % de corrección. Se evaluó la toxicidad de los P-PMO por medición de los pesos de los ratones durante el curso de los tratamientos e inmediatamente antes de la necropsia.

5 La restauración de productos de corte y empalme de EGFP funcionales después del tratamiento con distintos P-PMO basada en el análisis de RT-PCR de los tejidos se muestra en las Figuras 7A-P. El análisis de toxicidad basada en los pesos de los ratones tratados con P-PMO indicaba una toxicidad mínima (no mostrado). La captación óptima del vehículo peptídico de cada tejido (indicado con un *) basada en estos resultados se resume en la Tabla 2 (véase anteriormente).

10 Ejemplo 2. Evaluación de los PMO conjugados a un péptido de penetración celular (CPP) y/o a un péptido de asentamiento (HP) específico del músculo en el modelo murino MDX de distrofia muscular de Duchenne

15 Se trataron los ratones MDX con una serie de P-PMO (PMO conjugados con péptidos) que contenían distintas combinaciones de CPP específicos del músculo y HP conjugados al PMO antisentido M23d. El CPP específico del músculo que se utilizó era el "péptido B", también denominado CP06062 (SEQ ID NO: 19), y el péptido de asentamiento específico del músculo, denominado SMP1, tenía la SEQ ID NO: 51. Se ensayaron cuatro combinaciones incluyendo CP06062-PMO, MSP-PMO, CP06062-MSP-PMO y MSP-CP06062-PMO, cuyas composiciones se muestran en la Tabla de secuencias adjunta. El PMO antisentido M23d (SEQ ID NO: 77) tiene una secuencia dirigida para inducir una omisión del exón 23 en el gen de la distrofina y restaura la distrofina funcional.

20 Los ratones recibieron seis inyecciones intravenosas semanales de una dosis de 3 mg/kg. Los ratones tratados se sacrificaron y se retiraron distintos tejidos musculares y se tiñó la distrofina de longitud completa utilizando una tinción con anticuerpo fluorescente específico de distrofina.

25 Los resultados de los conjugados CP06062-PMO, MSP-CP06062-PMO y CP06062-MSP-PMO de cinco tejidos musculares diferentes se muestra en la Figura 8. Como se puede ver, la tinción específica de distrofina se evidencia mucho más para el compuesto MSP-CP06062-PMO que para los otros dos conjugados, con la excepción del músculo cardíaco, en el que el conjugado CP06062-MSP-PMO parece tener la mayor actividad. La observación de que el compuesto CP06062-MSP-PMO era más eficaz que el conjugado CP06062-PMO se confirmó por ensayos de inmunotransferencia y PCR (datos no mostrados). En experimentos diferentes (datos no mostrados), un conjugado MSP-PMO inducía distrofina de longitud completa a un nivel menor que el conjugado CP06062-PMO.

35 Ejemplos adicionales de suministro específico del músculo del conjugado CP06062-M23d a los tejidos del ratón MDX se pueden encontrar en Jearawiriyapaisam, Moulton et al., 2008, citado anteriormente.

40 En resumen, la combinación del péptido de asentamiento específico del músculo y el péptido de penetración celular específico del músculo mejora significativamente el suministro del péptido antisentido M23d según se mide en este sistema *in vivo*. Se observó que el MSP-CP06062-PMO en este orden de restos peptídicos inducía el mayor nivel de distrofina de longitud completa y es una realización preferida.

Tabla de secuencias

Denominación(es)	Secuencia	SEQ ID NO. ^a
Oligómeros antisentido		
705	5'-CCT CTT ACC TCA GTT ACA-3'	1
654	5'-GCT ATT ACC TTA ACC CAG-3'	2
Péptidos de penetración celular (CPP)		
R ₈	RRRRRRRR-XB	3
r ₈	rrrrrrr-XB	4
R ₉	RRRRRRRRR-XB	5
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXR-XB	6
(rX) ₈	rXrXrXrXrXrXrX-B	7
(RX) ₇	RXRXRXRXRXR-XB	8
(RX) ₅	RXRXRXR-XB	9
(RX) ₃	RXR-XB	10
(RXR) ₄	RXRXRXRXR-XB	11
(rXR) ₄	rXRrXRrXRrXR-B	12
(rXr) ₄	rXrXrXrXr-XB	13
(RB) ₈	RBRBRBRBRBRB-B	14
(rB) ₈	rBrBrBrBrBrBrB-B	15
(RB) ₇	RBRBRBRBRBRB-B	16
(RB) ₅	RBRBRBRB-B	17
(RB) ₃	RBRB-B	18
B(3b); CP06062; (RXRRBR) ₂ -XB	RXRRBRRRBR-XB	19
D (2); (RB) ₅ RXBRX-B	RBRBRBRBRXRBRX-B	20

ES 2 694 726 T3

Denominación(es)	Secuencia	SEQ ID NO. ^a
E(3c); (RBRBRBRX) ₂ -X	RBRBRBRXRBRBRBRX-X	21
F (3a); X-RB) ₃ RX(RB) ₃ RX	X-RBRBRBRXRBRBRBRX	22
G(4b); (RBRX) ₄ B	RBRXRBRXRBRXRBRX-B	23
H (4a); (RB) ₄ (RX) ₄ B	RBRBRBRBRXRXRXRX-B	24
I(3d); RX(RB) ₂ RX(RB) ₃ RX-X	RXRBRBRXRBRBRBRX-X	25
C(4c); (RXR) ₃ RBR-XB	RXRRXRXRBRBR-XB	26
(RB) ₇ RX-B	RBRBRBRBRBRBRBRX-B	27
Péptidos de asentamiento (HP) (NH ₂ a COOH)		
Músculo esquelético - SMP1	ASSLNIA	51
SMP2	SLGSFP	52
SMP3	SGASAV	53
SMP4	GRSGAR	54
SMP5	TARGEHKEEELI	55
Músculo cardíaco - CMP1	WLSEAGPWTVRALRGTGSW	56
CMP2	VTVRALRGTSW	57
CMP3	WTVRALRGTGSW	58
CMP4	CRPPR	59
CMP5	SKTFNTHPQSTP	60
Pulmón	CGFECVRQCPCER	61
Próstata	SMAIARL	62
Cerebro	CLSSRLDAC	63
Células madre hematopoyéticas	STFTKSP	64
Piel	CVALCREACGEGC	65
Páncreas - Panel	SWCEPGWCR	66
Panc2	CRVASV LPC	67
Panc3	LSGTPERSGQAVKVKLKAIP	68
Intestino	YSGKWGW	69
Tumor de vejiga	CSNRDARRC	70
Tumor de mama	Péptido cíclico cCPGPEGAGC (PEGA)	71
Células dendríticas	FYPSYHSTPQRP	72
Tumor	CGKRK	73
Tumores vasculares	KDEPQRRSARLSAKPAPPKPEPKPKK APAKK	74
Tumores endoteliales	CGNKRTRGC	75
Hepatocitos	FQHPSFI	76
Oligómeros antisentido y secuencias diana (5' a 3')		
CYP3A4	GTCTGGGATGAGAGCCATCAC	28
CYP3A4	CTGGGATGAGAGCCATCAC	29
CYP3A4	CTGGGATGAGAGCCACT	30
hu c-myc (AVI-4126)	ACGTTGAGGGGCATCGTCGC	31
hu c-myc	GGCATCGTCGCGGGAGGCTC	32
Hu-TNFR2	CCACAATCAGTCCTAG	33
A VI-4658 (hu-distrofina, exon 51)	CTCCAACATCAAGGAAGATGGCAT TTCTAG	34
Miostatina humana SD1	ACTCTGTAGGCATGGTAATG	35
Miostatina humana SD2	CAGCCCATCTTCTCCTGG	36
Miostatina humana SA2	CACTTGCATTAGAAAATCAG	37
Miostatina humana SA3	CTTGACCTCTAAAAACGGATT	38
Miostatina humana-AUG	GAGTTGCAGTTTTTGCATG	39
VHC-AUG	GTGCTCATGGTGCACGGTC	40
FLUA (-) NP-3'trm	AGCAAAAAGCAGGGTAGATAATC	41
FLUA PB1-AUG	GACATCCATTCAAATGGTTTG	42
Receptor de andrógeno humano	CTGCACTTCCATCCTTGAGC	43
TGF-β1	GAGGGCGGCATGGGGGAGGC	44
Receptor de TGF-β Tipo II	GACCCATGGCAGCCCCGTCG	45
Unión de corte y empalme de TGF-β1	GCAGCAGTTCTTCTCCGTGG	46
ARNr 16S bacteriano de consenso	GGACTACGACGCACTTTATGAG	47
Virus respiratorio sincitial	TAATGGGATCCATTTTGTCCC	48
AVI-5656 (hu-distrofina, exon 50)	CCACTCAGAGCTCAGATCTTCTAAC TTCC	49
VHC-143'	GTACTIONCGTTCCGCAGACCAC	50

ES 2 694 726 T3

Denominación(es)	Secuencia	SEQ ID NO. ^a
PMO antisentido M23d	GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAA T	77
Péptido de penetración celular (NH ₂ a COOH y 5' de / péptido de asentamiento / conjugados PMO 3')		
Denominaciones	Composición (con enlazadores)	SEQ ID NO. del componente
MSP-PMO	ASSLNIA-XB- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	51, 77
CP06062-MSP-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB-ASSLNIA-X- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	19, 51, 77
MSP-CP06062-PMO	ASSLNIA-X-RXRRBRRXRRBR-B- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	51, 19, 77
CP06062-PMO	RXRRBRRXRRBR-XB- GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT	19, 77
^a En las SEQ ID NO. 3-27, las secuencias asignadas al SEQ ID NO. no incluye la parte de enlazador (X, B, o XB).		

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> AVI BioPharma, Inc. MOULTON, Hong M. IVERSEN, Patrick L.
- <120> CONJUGADOS PEPTÍDICOS ESPECÍFICOS DE TEJIDO Y MÉTODOS
- <130> 504508083W00
- 10 <140> A asignar
<141> 30-06-2008
- <150> US-60/937.725
<151> 29-06-2007
- 15 <160> 77
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- 20 <210> 1
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> Oligómero antisentido sintético
- <400> 1
cctcttacct cagttaca 18
- 30 <210> 2
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> Oligómero antisentido sintético
- 40 <400> 2
gctattacct taaccag 18
- <210> 3
<211> 8
<212> PRT
- 45 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Péptido de penetración celular sintético
- 50 <400> 3

ES 2 694 726 T3

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

5 <210> 4
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido de penetración celular sintético

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)...(8)
<223> Xaa = D-arginina

<400> 4

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

20 <210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Péptido de penetración celular sintético

<400> 5

Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
1 5

30 <210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido de penetración celular sintético

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (2)...(16)
<223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

45 <400> 6

Arg Xaa
1 5 10 15

50 <210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Péptido de penetración celular sintético

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1), (3), (5), (7), (9), (11), (13), (15)
<223> Xaa = D-arginina

ES 2 694 726 T3

<211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)...(13)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

10

<400> 11

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Xaa
 1 5 10

15

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1), (4), (7), (10)
 <223> Xaa = D-arginina

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (5), (8), (11)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

35

<400> 12

Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Arg Xaa Xaa Arg
 1 5 10

40

<210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1), (3), (4), (6), (7), (9), (10), (12)
 <223> Xaa = D-arginina

50

<220>
 <221> MOD_RES <222> (2), (5), (8), (11)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

55

<400> 13

Xaa
 1 5 10

60

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT

<221> MOD_RES
 <222> (2)...(10)
 <223> Xaa = beta-alanina

5 <400> 17

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa
 1 5 10

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)...(6)
 <223> Xaa = beta-alanina

20 <400> 18

Arg Xaa Arg Xaa Arg Xaa
 1 5

25

<210> 19
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (8)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5), (11)
 <223> Xaa = beta-alanina

45 <400> 19

Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
 1 5 10

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (4), (6), (8), (10), (14)
 <223> Xaa = beta-alanina

60

<220>
 <221> MOD_RES

ES 2 694 726 T3

<222> (8), (16)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

5 <400> 20

Arg Xaa
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (4), (6), (10), (12), (14)
 <223> Xaa = beta-alanina

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12), (16)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

25 <400> 21

Arg Xaa
 1 5 10 15

30 <210> 22
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8), (16)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (4), (6), (10), (12), (14)
 <223> Xaa = beta-alanina

<400> 22

Arg Xaa
 1 5 10 15

50 <210> 23
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (6), (10), (14)

ES 2 694 726 T3

<223> Xaa = beta-alanina

<220>
 <221> MOD_RES
 5 <222> (4), (8), (12), (16)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 23

Arg Xaa
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 16
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (4), (6), (8)
 <223> Xaa = beta-alanina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10), (12), (14), (16)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<400> 24

Arg Xaa
 1 5 10 15

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (8), (16)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4), (6), (10), (12), (14)
 <223> Xaa = beta-alanina

<400> 25

Arg Xaa
 1 5 10 15

<210> 26
 <211> 12
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético 220
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (5), (8)
 5 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)
 10 <223> Xaa = beta-alanina

<400> 26

 Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg Arg Xaa Arg
 1 5 10

15 <210> 27
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido de penetración celular sintético

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2), (4), (6), (8), (10), (12), (14)
 <223> Xaa = beta-alanina

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)
 <223> Xaa = ácido 6-aminohexanoico

35 <400> 27

 Arg Xaa
 1 5 10 15

40 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

<400> 28
 gtctgggatg agagccatca c 21

50 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

<400> 29
 ctgggatgag agccatcac 19

60 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

5 <400> 30
 ctgggatgag agccatcact 20

10 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

20 <400> 31
 acgttgaggg gcatcgtcgc 20

25 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

35 <400> 32
 ggcatcgtcg cgggaggctc 20

40 <210> 33
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

50 <400> 33
 ccacaatcag tcctag 16

55 <210> 34
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

65 <400> 34
 ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

70 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

80 <400> 35
 actctgtagg catggaatg 20

85 <210> 36
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

5 <400> 36
 cagcccatct tctctgg 18

10 <210> 37
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

<400> 37
 cactgcatg agaaaatcag 20

20 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

<400> 38
 ctgacctct aaaaacggat t 21

30 <210> 39
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

<400> 39
 gagttgcagt tttgcatg 19

40 <210> 40
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

50 <400> 40
 gtgctcatgg tgcacggtc 19

<210> 41
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

60 <400> 41
 agcaaaagca ggtagataa tc 22

65 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

5 <400> 42
 gacatccatt caaatggttt g 21

10 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

20 <400> 43
 ctgcacttcc atccttgagc 20

25 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

35 <400> 44
 gagggcggca tgggggaggc 20

40 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

50 <400> 45
 gacctatggc agccccgtc g 21

55 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

65 <400> 46
 gcagcagttc ttctccgtgg 20

70 <210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

80 <400> 47
 ggactacgac gcacttatg ag 22

85 <210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 694 726 T3

<220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

 <400> 48
 5 taatgggatc catttgtcc c 21

 <210> 49
 <211> 29
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

 <400> 49
 15 ccactcagag ctcatgtctt ctaactcc 29

 <210> 50
 <211> 24
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligómero antisentido sintético

 <400> 50
 25 gtactcaccg gttccgcaga ccac 24

 <210> 51
 <211> 7
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético

 <400> 51
 Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala
 1 5

 <210> 52
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético

 <400> 52
 Ser Leu Gly Ser Phe Pro
 1 5

 <210> 53
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético

 <400> 53
 Ser Gly Ala Ser Ala Val
 1 5

 60

ES 2 694 726 T3

<210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 <400> 54
 Gly Arg Ser Gly Ala Arg
 1 5
 <210> 55
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 20
 <400> 55
 Thr Ala Arg Gly Glu His Lys Glu Glu Glu Leu Ile
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 30
 <400> 56
 Trp Leu Ser Glu Ala Gly Pro Val Val Thr Val Arg Ala Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Trp
 20
 <210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 40
 <400> 57
 Val Thr Val Arg Ala Leu Arg Gly Thr Ser Trp
 1 5 10
 <210> 58
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 55
 <400> 58
 Val Val Thr Val Arg Ala Leu Arg Gly Thr Gly Ser Trp
 1 5 10

ES 2 694 726 T3

<210> 59
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
10
<400> 59
Cys Arg Pro Pro Arg
1 5
<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
20
<400> 60
Ser Lys Thr Phe Asn Thr His Pro Gln Ser Thr Pro
1 5 10
<210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
25
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
30
<400> 61
Cys Gly Phe Glu Cys Val Arg Gln Cys Pro Glu Arg Cys
1 5 10
35
<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
40
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
45
<400> 62
Ser Met Ala Ile Ala Arg Leu
1 5
<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
55
<400> 63
Cys Leu Ser Ser Arg Leu Asp Ala Cys
1 5

ES 2 694 726 T3

5
<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
<400> 64
Ser Thr Phe Thr Lys Ser Pro
1 5

10
<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
<400> 65
Cys Val Ala Leu Cys Arg Glu Ala Cys Gly Glu Gly Cys
1 5 10

15
<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
<400> 66
Ser Trp Cys Glu Pro Gly Trp Cys Arg
1 5

20
<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
<400> 67
Cys Arg Val Ala Ser Val Leu Pro Cys
1 5

25
<210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
<400> 68

30
<210> 68
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético
<400> 68

ES 2 694 726 T3

Leu Ser Gly Thr Pro Glu Arg Ser Gly Gln Ala Val Lys Val Lys Leu
 1 5 10 15
 Lys Ala Ile Pro
 20

5 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 <400> 69

Tyr Ser Gly Lys Trp Gly Trp
 1 5

15 <210> 70
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 <400> 70

Cys Ser Asn Arg Asp Ala Arg Arg Cys
 1 5

25 <210> 71
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 35 <400> 71

Cys Pro Gly Pro Glu Gly Ala Gly Cys Pro Glu Gly Ala
 1 5 10

40 <210> 72
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético
 <400> 72

Phe Tyr Pro Ser Tyr His Ser Thr Pro Gln Arg Pro
 1 5 10

50 <210> 73
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido de asentamiento sintético

ES 2 694 726 T3

<400> 73

Cys Gly Lys Arg Lys
1 5

5 <210> 74
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido de asentamiento sintético

<400> 74

Lys Asp Glu Pro Gln Arg Arg Ser Ala Arg Leu Ser Ala Lys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Pro Lys Pro Glu Pro Lys Pro Lys Lys Ala Pro Ala Lys Lys
20 25 30

15 <210> 75
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de asentamiento sintético

25 <400> 75

Cys Gly Asn Lys Arg Thr Arg Gly Cys
1 5

30 <210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Péptido de asentamiento sintéticos

<400> 76

Phe Gln His Pro Ser Phe Ile
1 5

40 <210> 77
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Oligómero antisentido sintético

50 <400> 77
ggccaaacct cggttacct gaaat 25

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado péptido-antisentido para el tratamiento de una determinada afección de enfermedad, que comprende un oligómero antisentido de morfolino fosforodiamidato dirigido contra un gen cuya expresión se asocia con la afección de enfermedad determinada de un tejido diana específico, y unido covalentemente al mismo, mediante un enlace XB, un péptido de penetración celular que tiene una secuencia de (RXRRBR)₂, donde R es arginina; B es β-alanina; y X es independientemente un aminoácido lineal neutro -C(O)-(CH₂)_n-NH-, donde n es 4-6, donde el péptido de penetración celular localiza selectivamente el oligómero antisentido en el tejido diana.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que
- (1) el oligómero de morfolino fosforodiamidato que contienen entre un 20-50 % de los enlaces del armazón cargados positivamente;
 - (2) el conjugado comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo para un tejido diana seleccionado, conjugado con el péptido de penetración celular, formando de esta manera un conjugado con la forma: péptido de penetración celular – péptido de asentamiento – oligómero antisentido; o
 - (3) el conjugado que comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo de un tejido diana seleccionado, conjugado con el péptido de penetración celular, formando de esta manera un conjugado con la forma: péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido.
3. El conjugado de la reivindicación 1 para su uso en
- (1) el aumento de la proliferación y supervivencia de células madre en la sangre periférica, en el que el péptido de penetración celular tiene una secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero se dirige contra el TGF-β humano;
 - (2) el tratamiento de restenosis cardíaca, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero se dirige contra la c-myc humana;
 - (3) el tratamiento de una infección respiratoria bacteriana, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia identificada por la SEQ ID NO: 19, y el oligómero se dirige contra un ARNr 16S bacteriano;
 - (4) la redirección metabólica de un compuesto xenobiótico metabolizado normalmente en el hígado, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19; y el oligómero se dirige contra una enzima hepática P450;
 - (5) el tratamiento de la hepatitis vírica, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero se dirige contra el virus de la hepatitis C y el virus de la hepatitis B;
 - (6) el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero tiene una secuencia eficaz para producir una omisión de exón en la distrofina proteica humana, para restaurar la actividad parcial de la distrofina proteica;
 - (7) el tratamiento de la pérdida de masa muscular esquelética en un sujeto humano, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero antisentido se dirige contra la miostatina humana;
 - (8) el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero tiene una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34, 49, y 36, o el conjugado es para su uso en el tratamiento de pérdida de masa muscular esquelética en un sujeto humano, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero antisentido se dirige contra la miostatina humana y tiene la secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 34, 49, 35, 36, 37, 38 y 39;
 - (9) el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero tiene una secuencia eficaz para producir una omisión de exón en la distrofina proteica humana, que comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo del tejido muscular, conjugado con el péptido de penetración celular, o el conjugado es para su uso en el tratamiento de la pérdida de masa muscular esquelética en un sujeto humano, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero antisentido se dirige contra la miostatina humana y comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectiva del tejido muscular, conjugado con el péptido de penetración celular;
 - (10) el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero tiene una secuencia eficaz para producir la omisión de exón en la distrofina proteica humana, que comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo del tejido muscular, conjugado con el péptido de penetración celular, en el que dicho péptido de asentamiento tiene una secuencia identificada como la SEQ ID NO: 51, o el conjugado es para su uso en el tratamiento de la pérdida de masa muscular esquelética en un sujeto humano, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero antisentido se dirige contra la miostatina humana y comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectiva del tejido muscular, conjugado con el péptido de penetración celular, en el que dicho péptido de asentamiento tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO: 51; o
 - (11) el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero tiene una secuencia eficaz para producir la omisión de exón en la distrofina proteica humana, que comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo del

tejido muscular, conjugado con el péptido de penetración celular, en el que dicho péptido de asentamiento tiene una secuencia identificada como la SEQ ID NO: 51 y en el que el conjugado tiene la forma: péptido de penetración celular – péptido de asentamiento – oligómero antisentido o péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido, y tiene la composición denominada en el presente documento como CP06062-MSP-PMO o MSP-CP06062-PMO, o el conjugado es para su uso en el tratamiento de la pérdida de masa muscular esquelética en un sujeto humano, en el que el péptido de penetración celular tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, y el oligómero antisentido se dirige contra la miostatina humana y comprende adicionalmente un péptido de asentamiento que es selectivo del tejido muscular, conjugado con un péptido de penetración celular, en el que dicho péptido de asentamiento tiene la secuencia identificada como SEQ ID NO: 51 y en el que el conjugado tiene la forma: péptido de penetración celular – péptido de asentamiento – oligómero antisentido o péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido, y tiene la composición denominada en el presente documento como CP06062-MSP-PMO o CP06062-MSP-PMO, en el que CP06062-MSP-PMO tiene la fórmula:

RXRRBRRXRRBR-XB-ASSLNIA-X-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT,

y
en el que MSP-CP06062-PMO tiene la fórmula:

ASSLNIA-X-RXRRBRRXRRBR-XB-GGCCAAACCTCGGCTTACCTGAAAT.

4. Un péptido de penetración celular que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19.

5. Un método para la preparación de una composición antisentido útil para el tratamiento de DMD o una enfermedad muscular debilitante en un sujeto mamífero, que comprende la preparación de un oligómero antisentido eficaz para suprimir las variantes truncadas de corte y empalme en la distrofina proteica expresada, o eficaz para suprimir la expresión de miostatina en el tejido muscular, respectivamente, cuando se administra a un sujeto mamífero, y se conjugaba con el oligómero, un péptido de penetración celular que tiene la secuencia identificada como la SEQ ID NO: 19.

6. Un método para la preparación de una composición antisentido útil para el tratamiento de una afección inflamatoria, que comprende la preparación de un oligómero antisentido eficaz para inducir la expresión de un receptor del TNF- α , cuando se administra el oligómero a un sujeto mamífero, y conjugando al oligómero, un péptido de penetración celular que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19.

7. El método de la reivindicación 5 o 6, en el que el oligómero antisentido es un oligómero antisentido de morfolino fosfordiamidato.

8. El método de la reivindicación 7, en el que el método incluye adicionalmente la conjugación de un péptido de asentamiento en el hígado con el oligómero y el péptido de penetración celular, para formar una composición de péptido de asentamiento – péptido de penetración celular – oligómero antisentido.

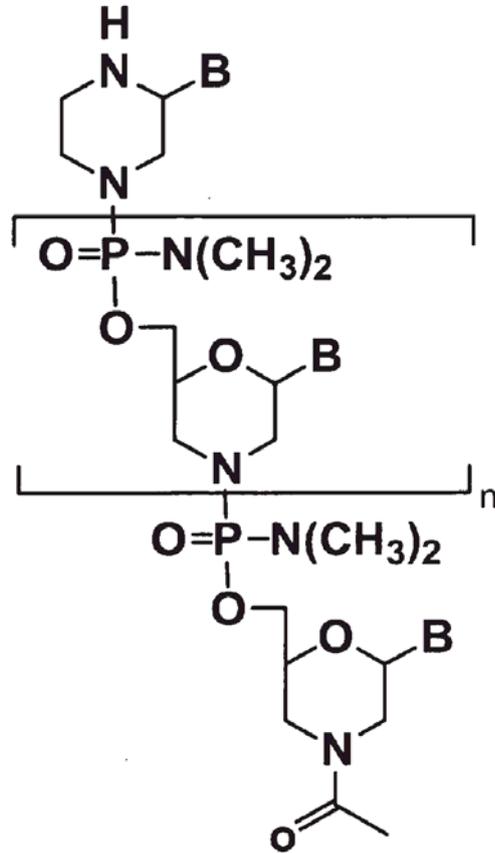


Fig. 1A

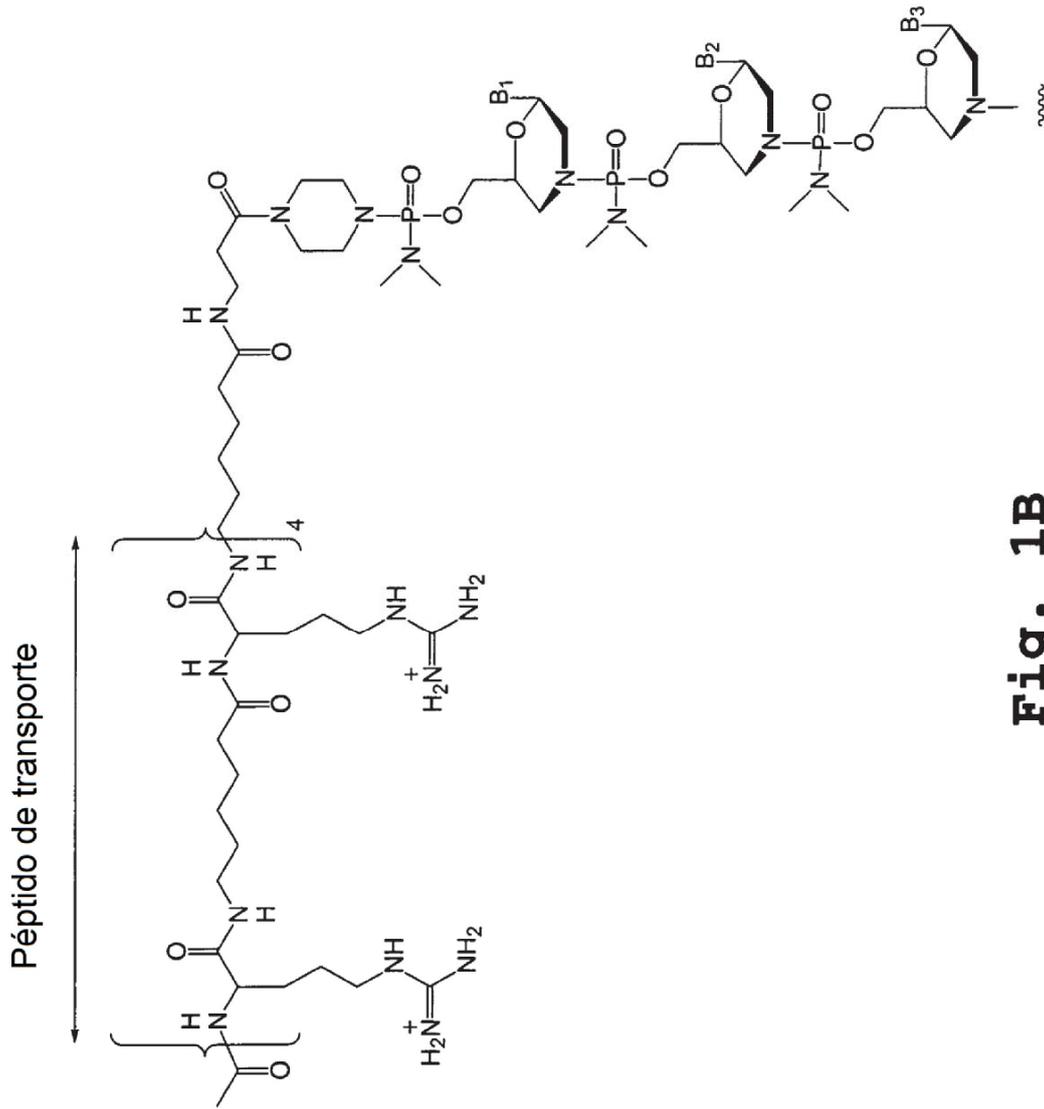


Fig. 1B

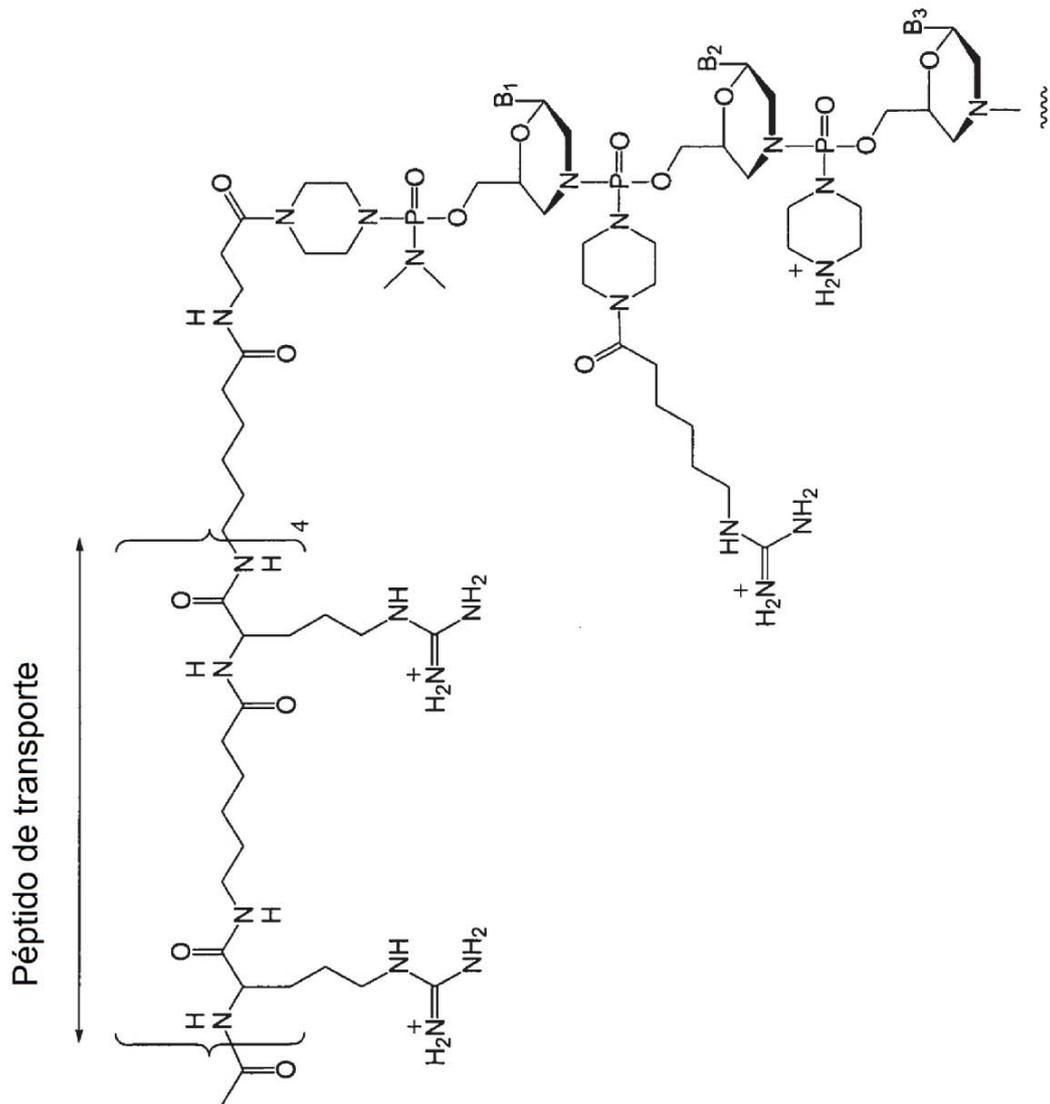


Fig. 1C

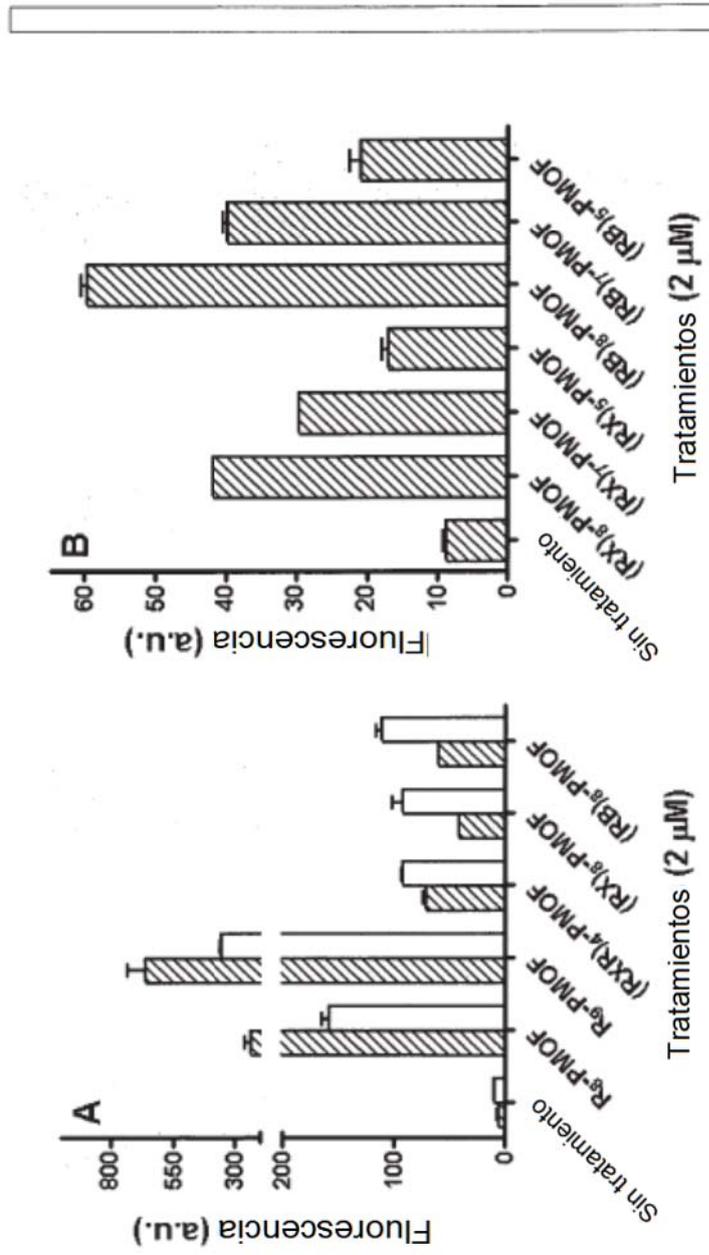
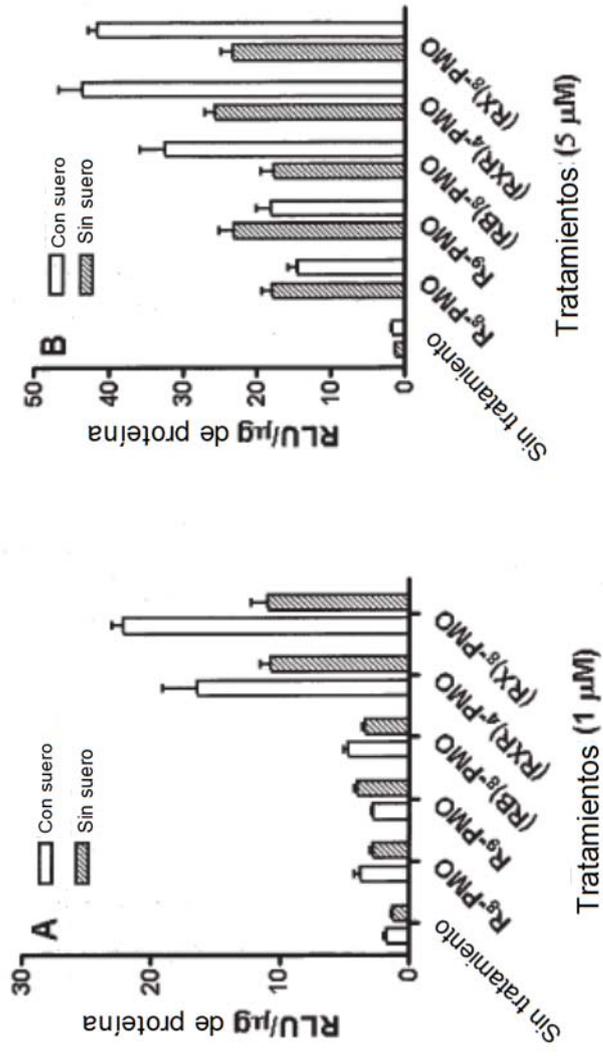
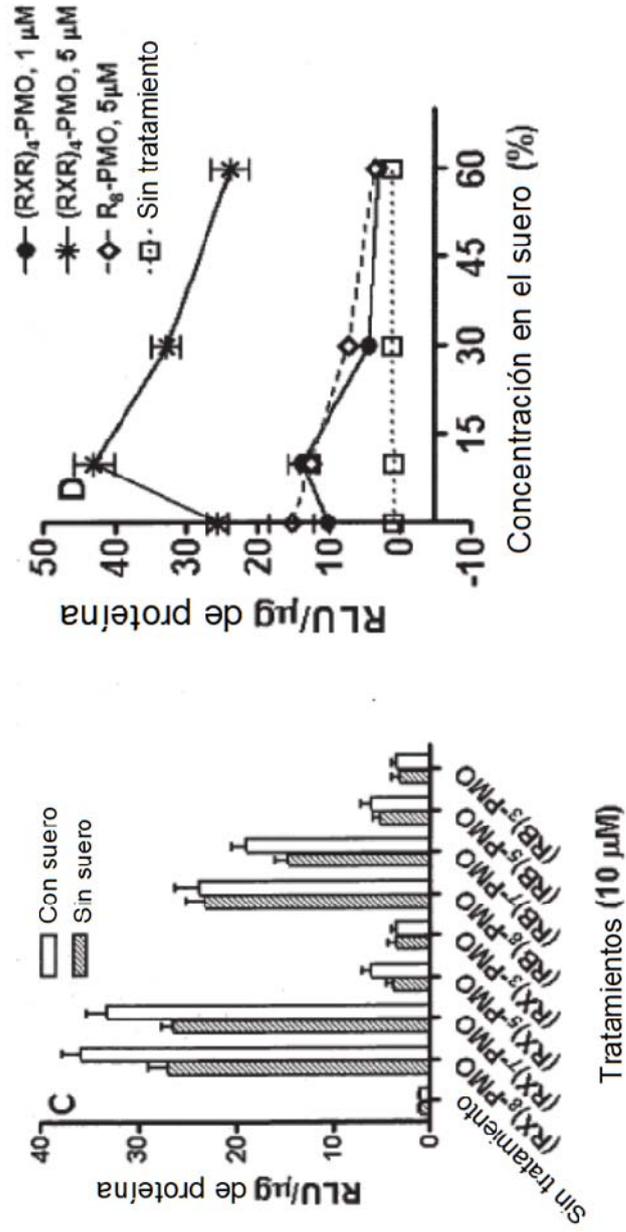


Fig. 2



Figs. 3A-B



Figs. 3C-D

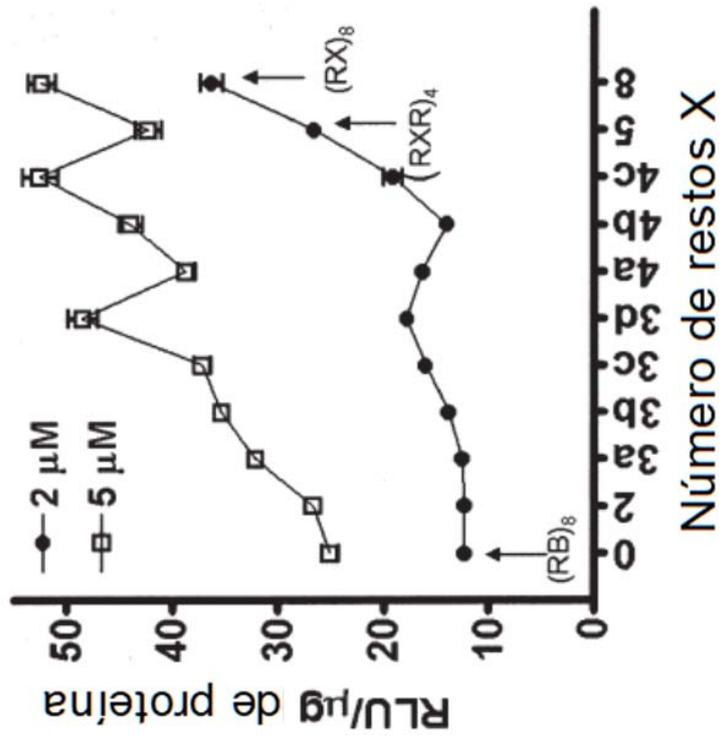


Fig. 4

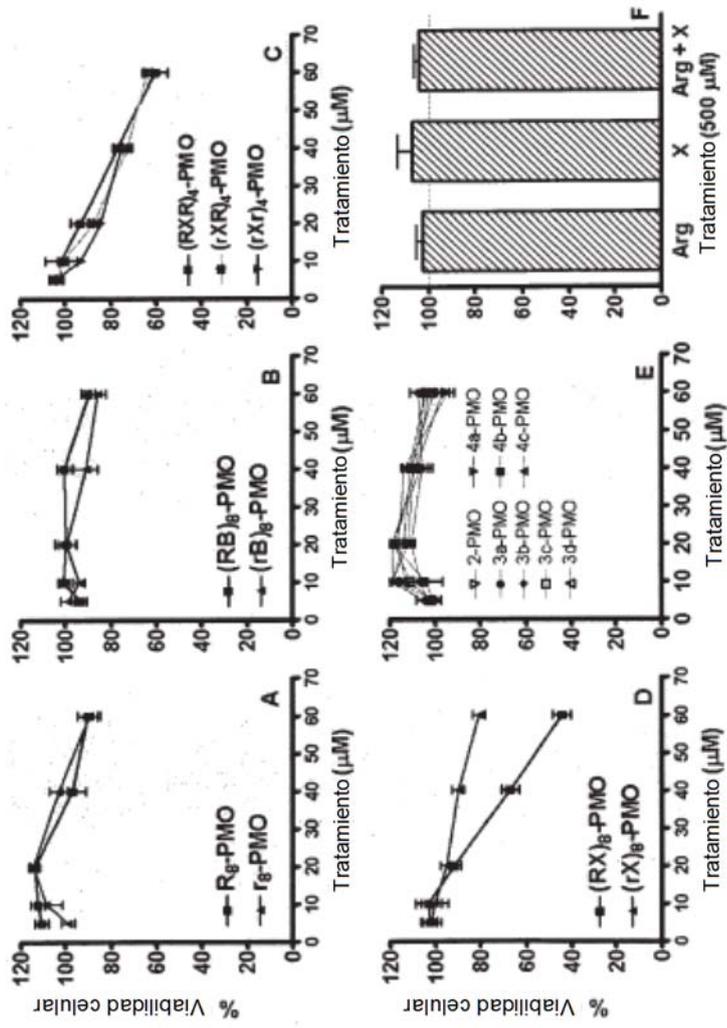
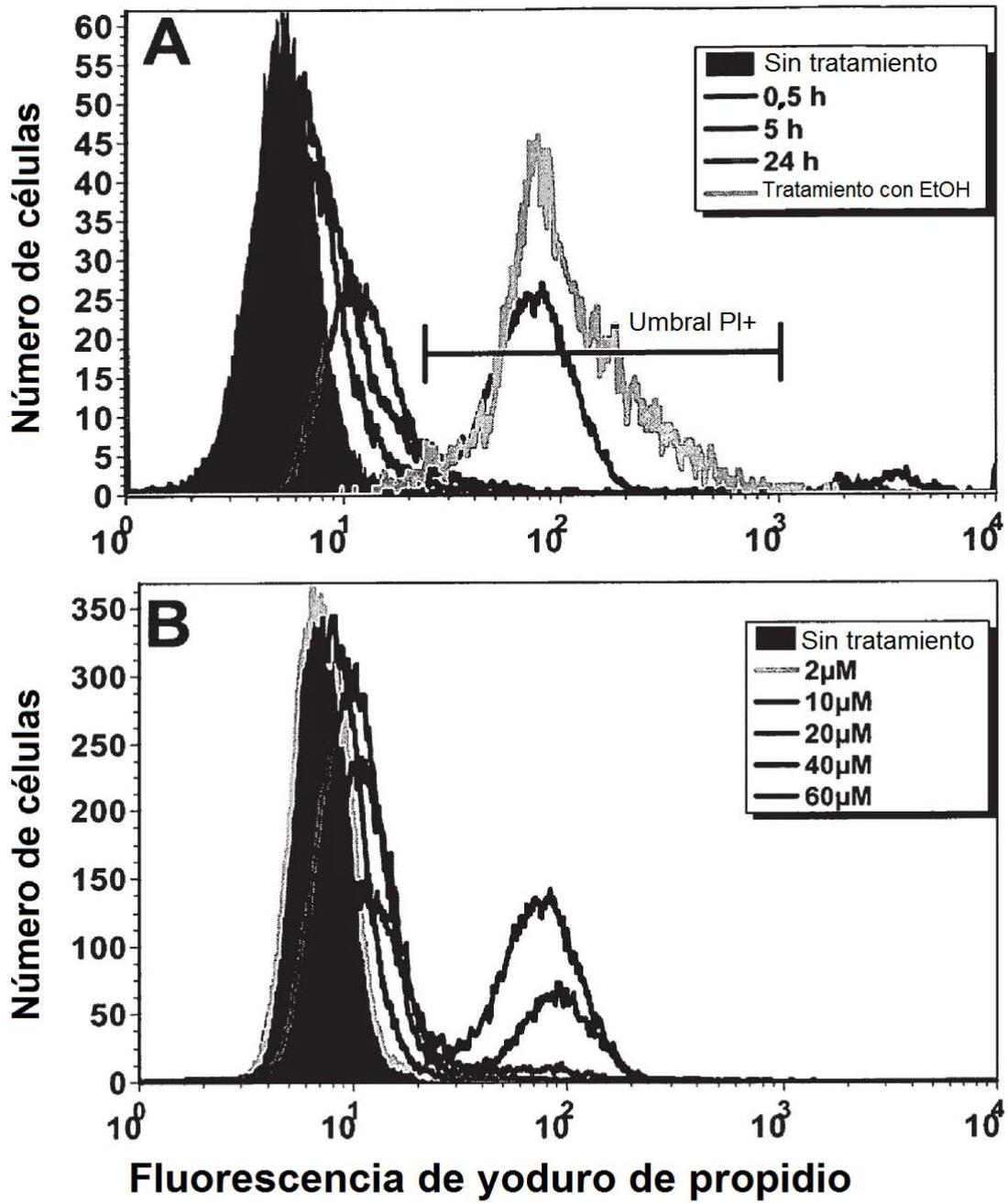
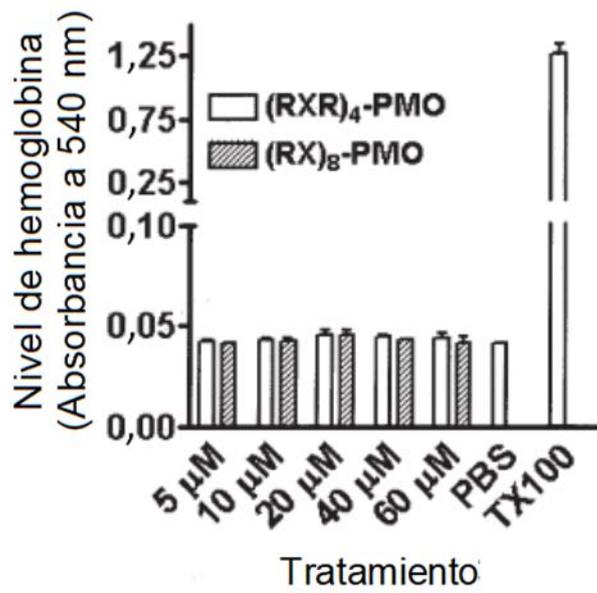
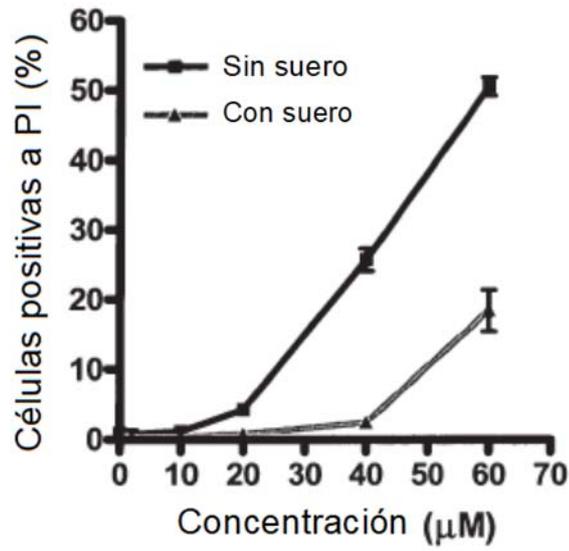


Fig. 5



Figs. 6A-B



Figs. 6C-D

Fig. 7B

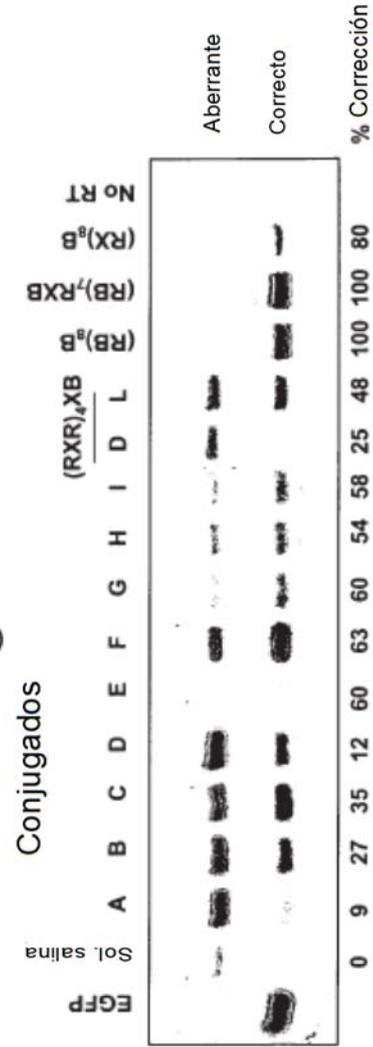
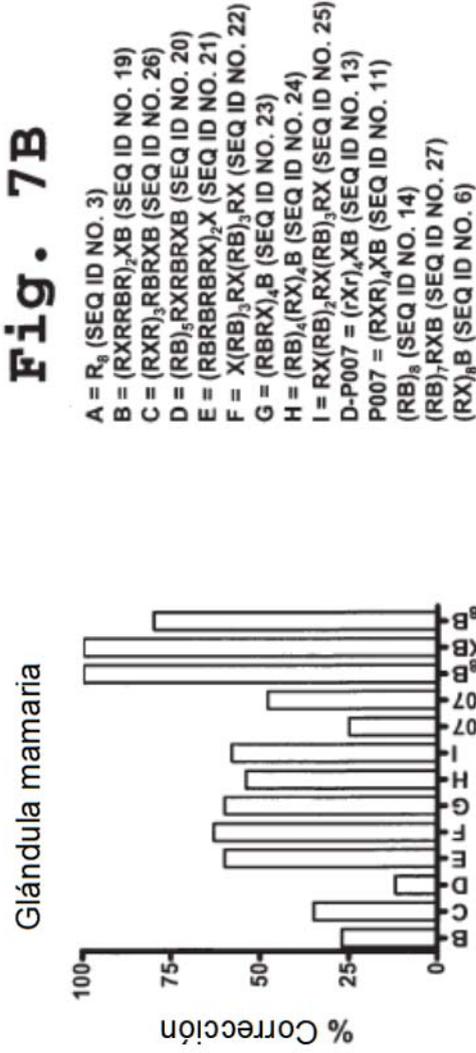
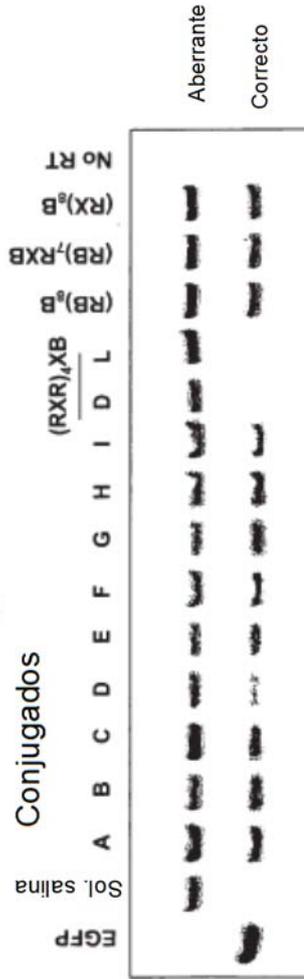


Fig. 7C



- A = R₆ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₅RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (RX)₄XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₂XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₈ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

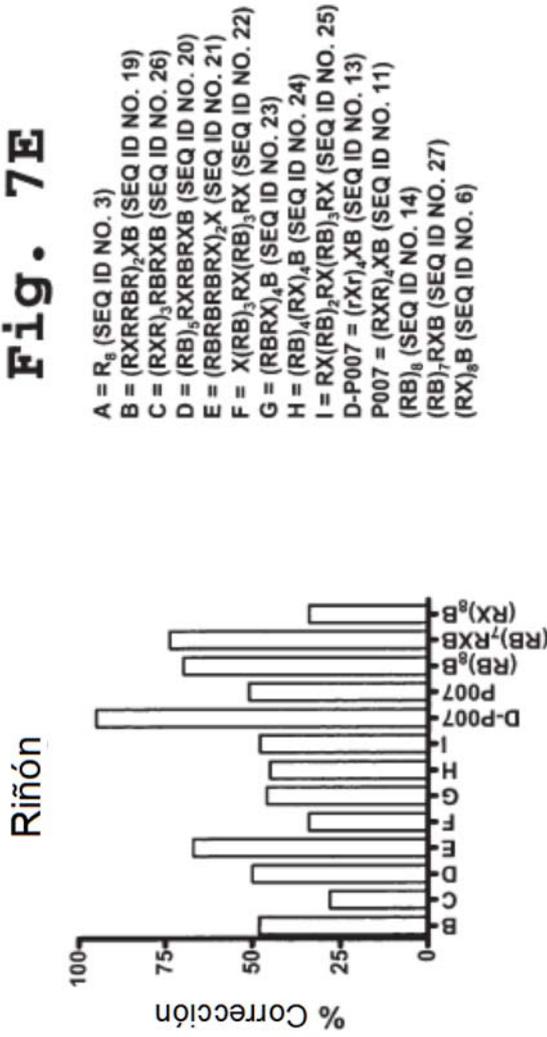


Nota: Todas las muestras son de ovario, excepto D- y L-(RXR)₂XB que son de glándula prostática

Fig. 7D



Fig. 7E



- A = R₆ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₂RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₅RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (rXr)₂XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₂XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₆ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

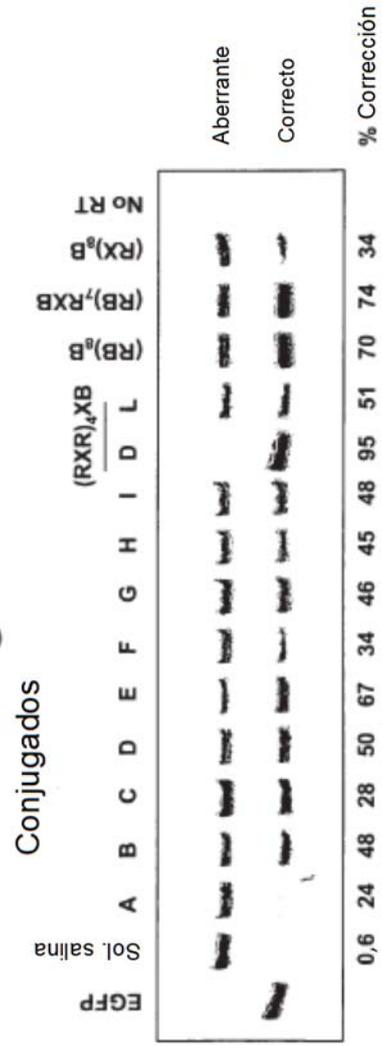


Fig. 7F

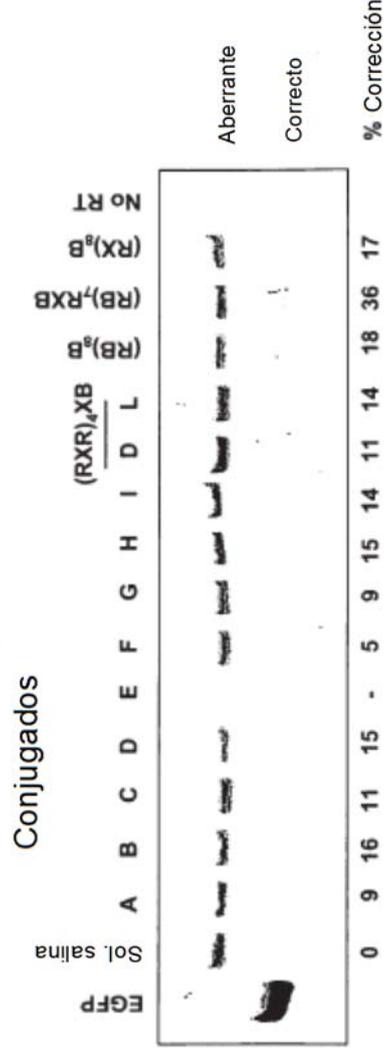
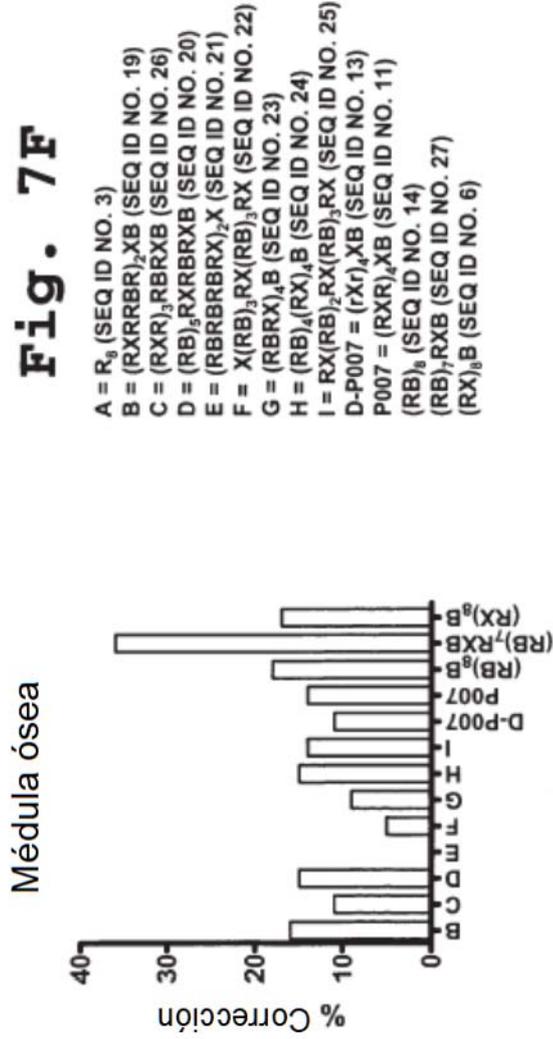
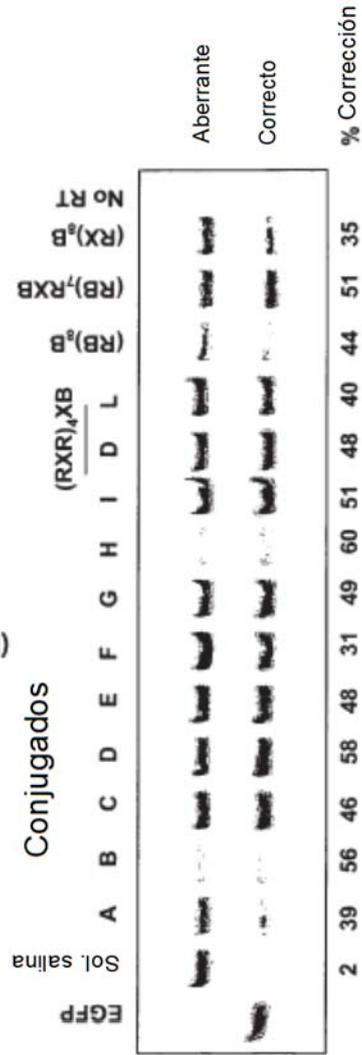
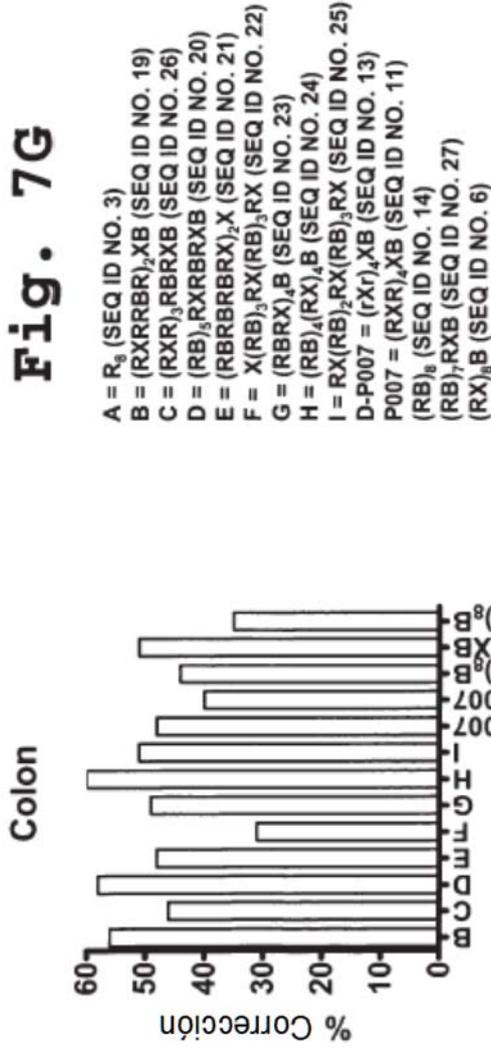


Fig. 7G



Músculos de la pata

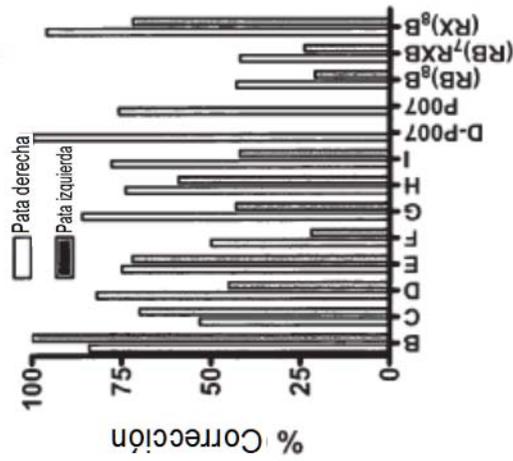
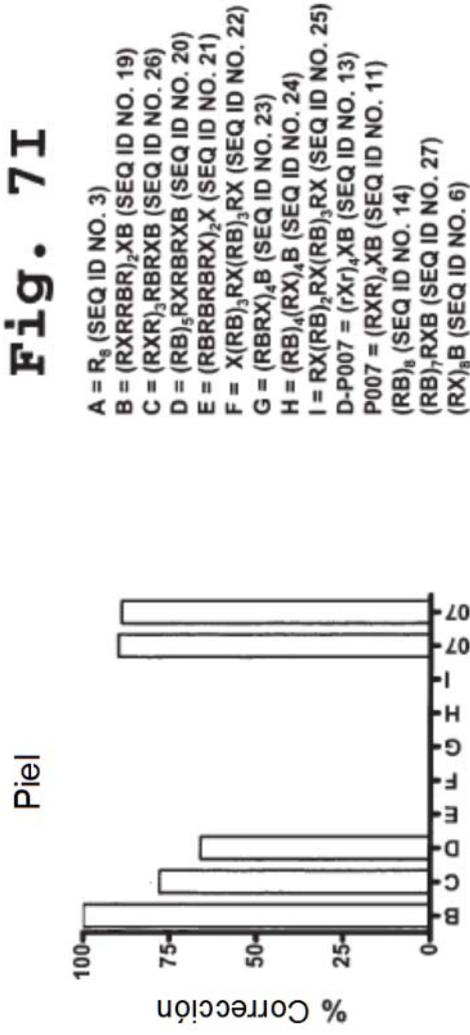


Fig. 7H

- A = R₈ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₅RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (RXr)₄XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₈ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)



Fig. 7I



- A = R₉ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₅RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (rXr)₄XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₈ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

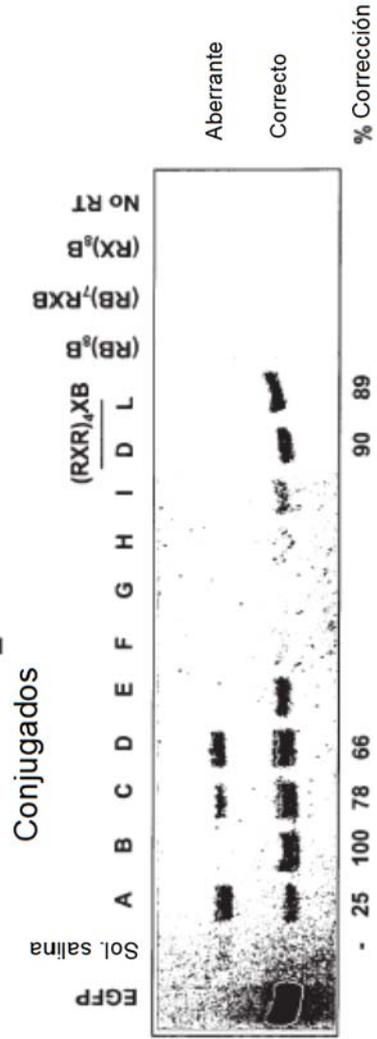


Fig. 7J

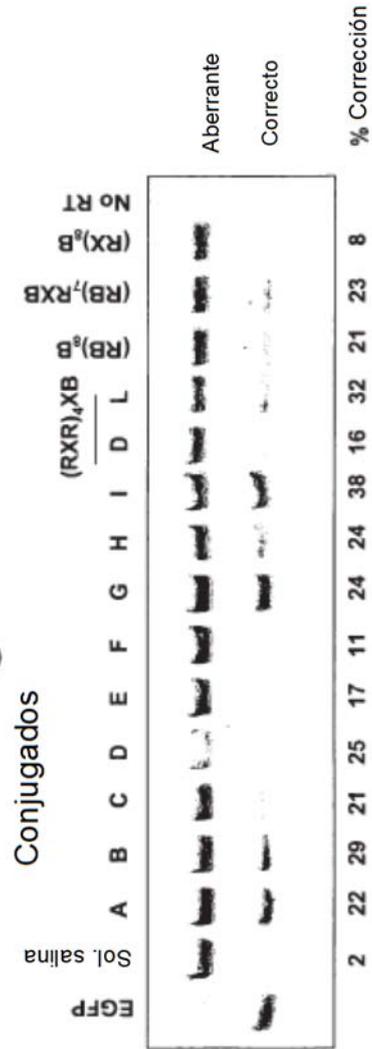
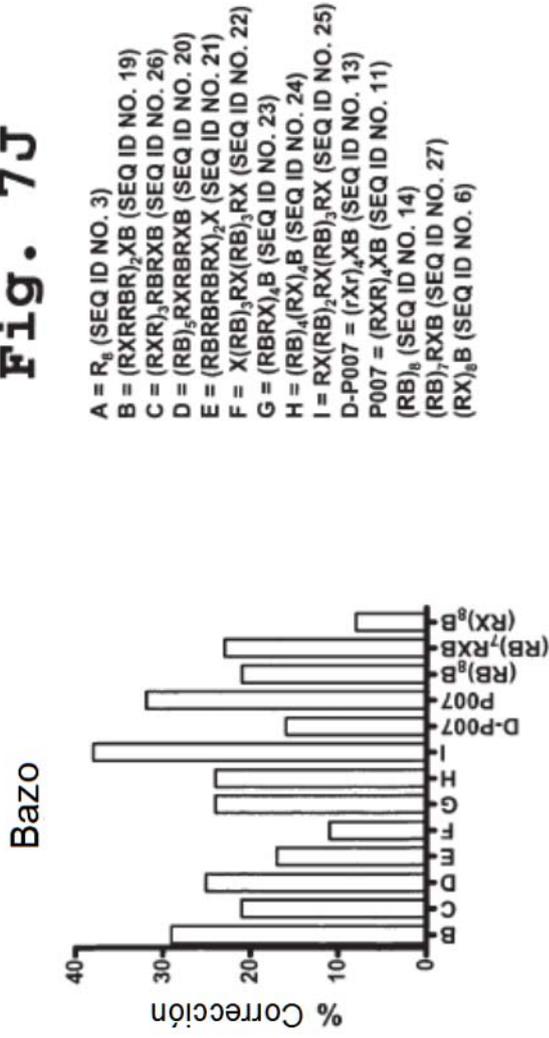
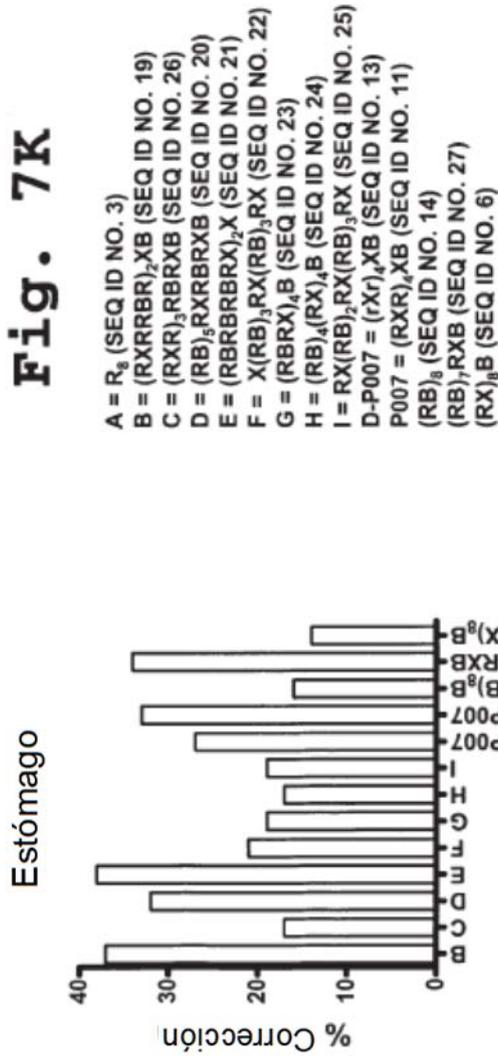


Fig. 7K



- A = R₈ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₅RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (rXr)₄XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₈ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

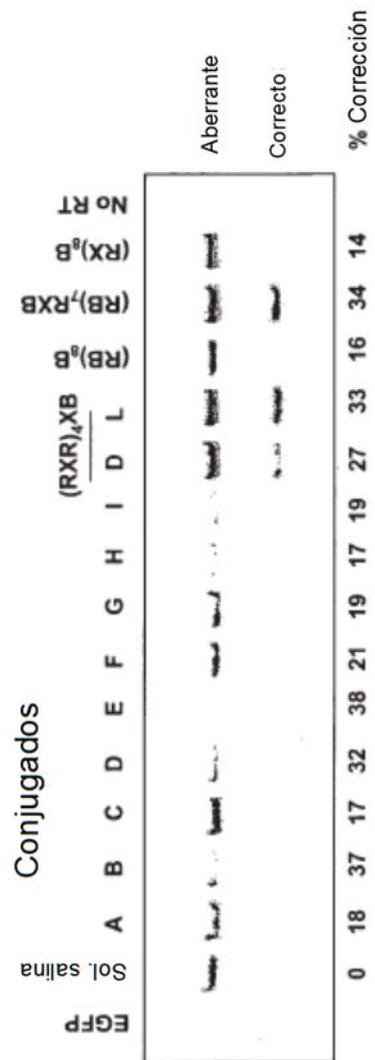
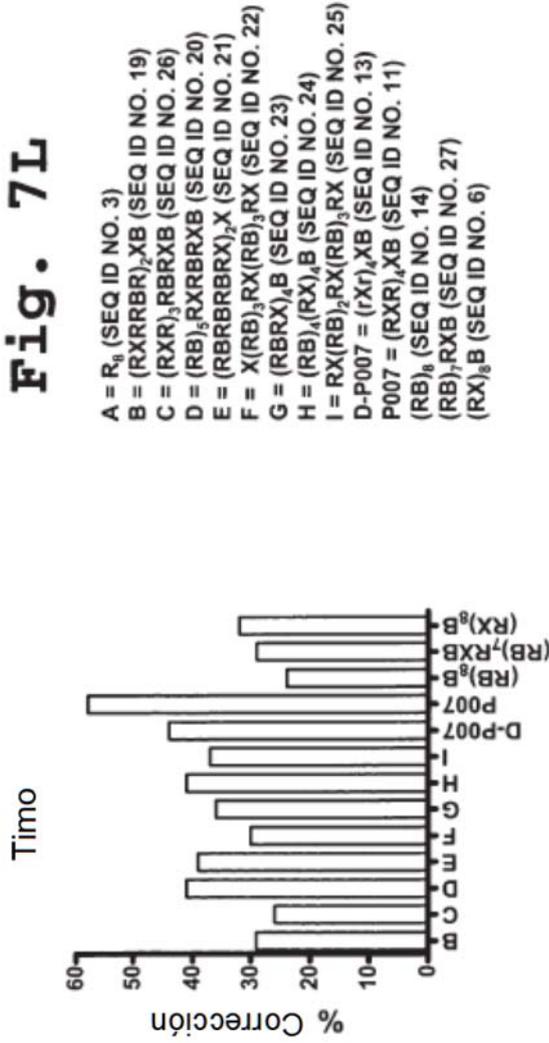


Fig. 7I

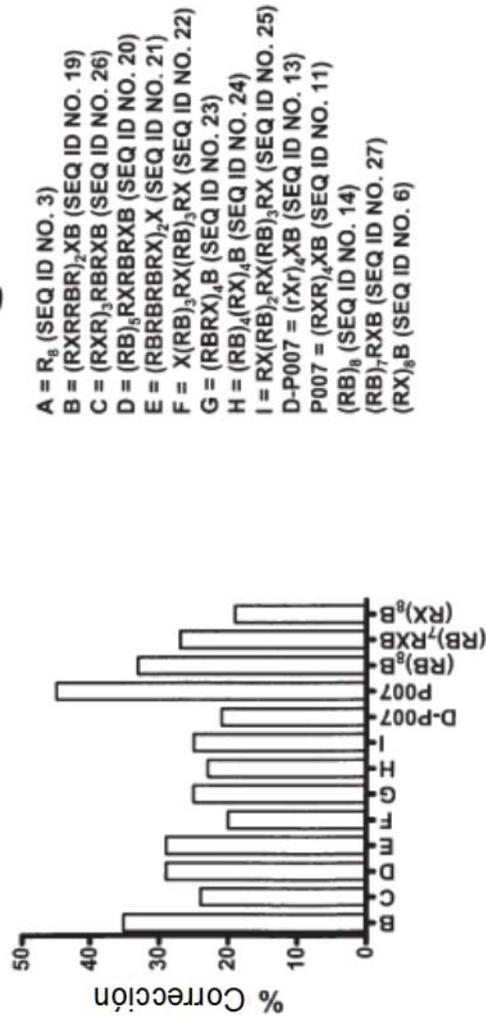


- A = R₆ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₅RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₆ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

		Conjugados																	
		(RXR) ₄ XB	(RB) ₆	(RB) ₇ RXB	(RX) ₈ B	No RT													
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	D	L	(RB) ₈ B	(RB) ₇ RXB	(RX) ₈ B				
EGFP		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Aberrante		
Sol. salina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Correcto		
	% Corrección	2	11	29	26	41	39	30	36	41	37	44	58	24	29	32	% Corrección		

Fig. 7N

Pulmón



- A = R₆ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₆RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (rXr)₂XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₈ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇-RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

Conjugados

Conjugado	EGFP	Sol. salina	(RXR) ₄ XB	(RB) ₈ B	(RB) ₇ -RXB	(RB) ₆ B	No RT
A	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0	0	0
D	0	0	0	0	0	0	0
P007	0	0	0	0	0	0	0
(RB)8B	0	0	0	0	0	0	0
(RB)7-RXB	0	0	0	0	0	0	0
(RB)6B	0	0	0	0	0	0	0
(RX)8B	0	0	0	0	0	0	0
(RX)7-RXB	0	0	0	0	0	0	0
(RX)6B	0	0	0	0	0	0	0
No RT	0	0	0	0	0	0	0

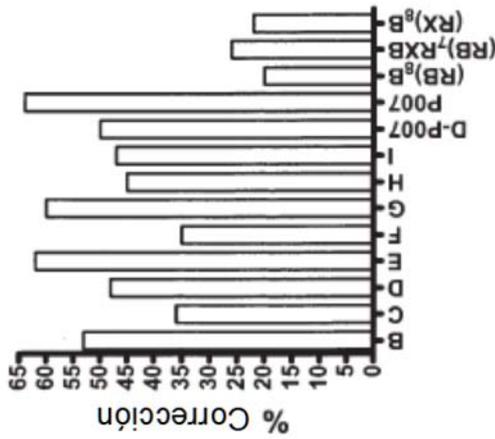
Aberrante
Correcto

% Corrección

0 10 35 24 29 29 25 23 25 21 45 33 27 19

Fig. 70

Intestino delgado



- A = R₆ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₅RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (rXr)₄XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₆ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

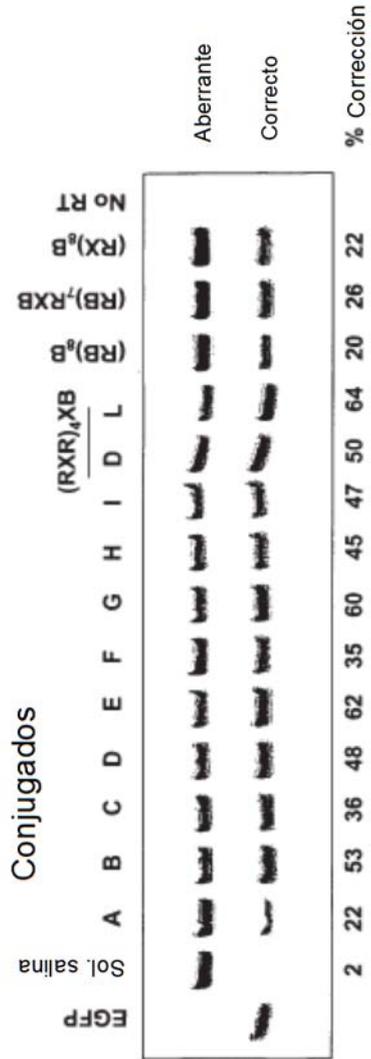
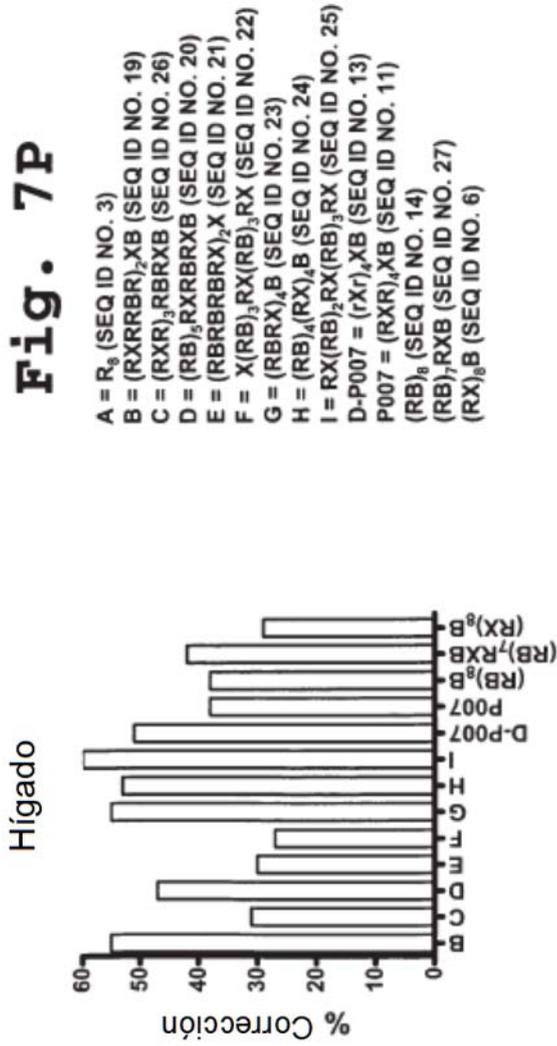


Fig. 7P



- A = R₉ (SEQ ID NO. 3)
- B = (RXRRBR)₂XB (SEQ ID NO. 19)
- C = (RXR)₃RBRXB (SEQ ID NO. 26)
- D = (RB)₇RXRBRXB (SEQ ID NO. 20)
- E = (RBRBRBRX)₂X (SEQ ID NO. 21)
- F = X(RB)₃RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 22)
- G = (RBRX)₄B (SEQ ID NO. 23)
- H = (RB)₄(RX)₄B (SEQ ID NO. 24)
- I = RX(RB)₂RX(RB)₃RX (SEQ ID NO. 25)
- D-P007 = (rXr)₁XB (SEQ ID NO. 13)
- P007 = (RXR)₄XB (SEQ ID NO. 11)
- (RB)₈ (SEQ ID NO. 14)
- (RB)₇RXB (SEQ ID NO. 27)
- (RX)₈B (SEQ ID NO. 6)

		Conjugados																
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	D	L	(RXR) ₄ XB	(RB) ₈ B	(RB) ₇ -RXB	(RX) ₈ B	No RT	
EGFP		26	63	55	31	47	30	27	55	53	60	51	38	38	42	29	Aberrante	Correcto
Sol. salina																		

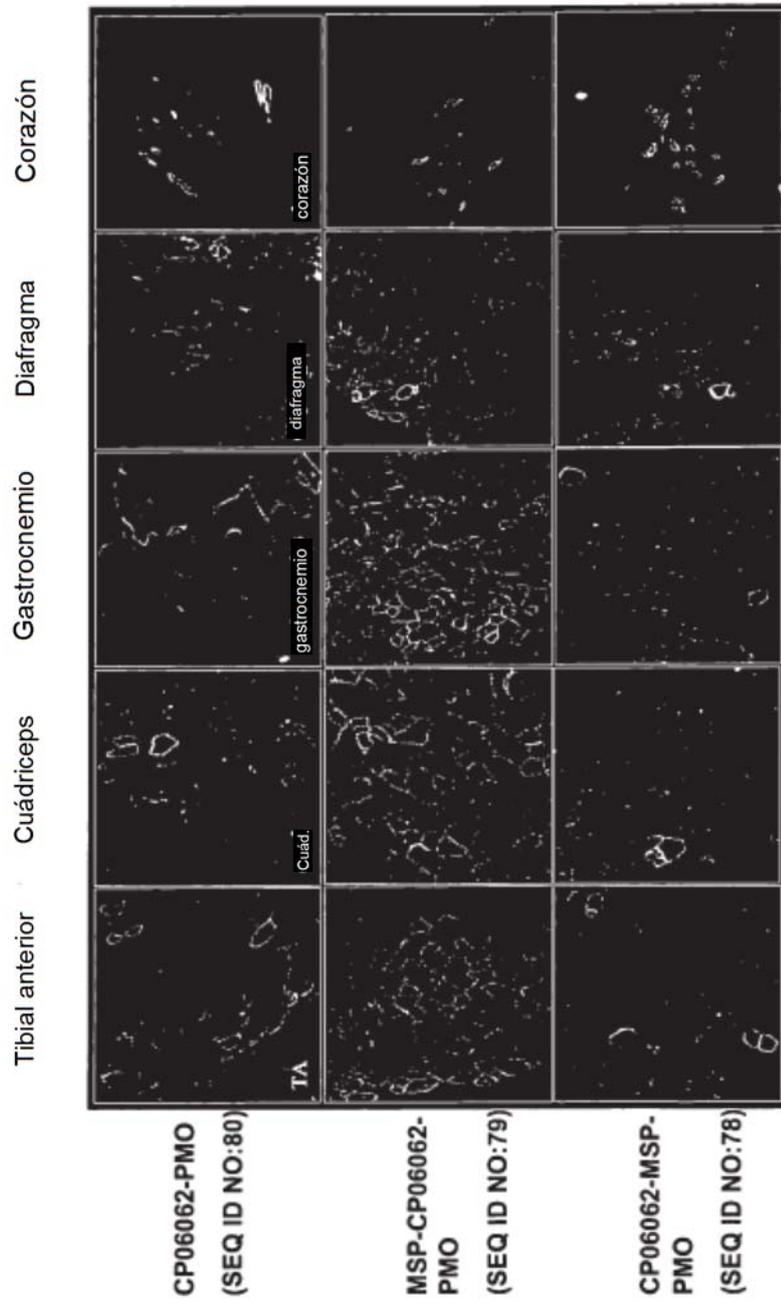


Fig. 8