(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 714 290**

(51) Int. CI.:

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029766**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14153240**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14723583 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2970964**

(54) Título: **Composiciones de salto de exón para el tratamiento de la distrofia muscular**

(30) Prioridad:

14.03.2013 US 201361782706 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2019

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

BESTWICK, RICHARD K. y
FRANK, DIANE ELIZABETH

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de salto de exón para el tratamiento de la distrofia muscular

Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos y composiciones antisentido novedosos adecuados para facilitar los saltos de exón en el gen de la distrofina humana. También proporciona métodos para inducir el salto de exón usando las composiciones antisentido novedosas adaptadas para su uso en los métodos de la invención.

Antecedentes de la invención

Las tecnologías antisentido están siendo desarrolladas usando una gama de estrategias químicas que afectan a la expresión génica a diferentes niveles (transcripción, corte y empalme, estabilidad, traducción). Mucha de esta investigación se ha enfocado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar los genes anormales o asociados con la enfermedad en un amplio abanico de indicaciones. Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica con especificidad, y debido a esto, muchos de los esfuerzos de búsqueda que conciernen a oligonucleótidos como moduladores de la expresión génica se han enfocado en la inhibición de la expresión de genes dirigidos o de la función de elementos activación en cis. Los oligonucleótidos antisentido están normalmente dirigidos contra el ARN, ya sea la cadena sentido (por ejemplo, ARNm), o la cadena menos en el caso de algunas dianas de ARN viral. Para lograr un efecto deseado de la regulación a la baja del gen específico, los oligonucleótidos generalmente promueven el deterioro del ARNm dirigido, bloquean la traducción del ARNm o bloquean la función de elementos de ARN activación en cis, por lo cual se previene efectivamente la síntesis nueva de la proteína diana o la replicación del ARN viral.

Sin embargo, dichas técnicas no son útiles cuando el objetivo es para regular al alza la producción de la proteína nativa o compensar mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tal como mutaciones sin sentido o de cambio de marco. En estos casos, la transcripción del gen defectuoso no debe ser sometida a degradación dirigida o inhibición estérica, por lo que la química de oligonucleótidos antisentido no debe promover el deterioro del ARNm diana ni el bloqueo de la traducción.

En una variedad de enfermedades genéticas, los efectos de las mutaciones sobre la expresión eventual de un gen se pueden modular a través de un proceso de salto de exón dirigido durante el proceso de corte empalme. El proceso de corte y empalme está dirigido por la compleja maquinaria multi-componente que proporciona uniones exón-intrón adyacentes en el pre-ARNm en proximidad cercana y realiza la escisión de enlaces fosfodiéster en los extremos de los intrones con su posterior reforma entre exones que se empalman juntos. Este proceso complejo y altamente preciso es mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm que son relativamente cortos, segmentos de ARN semiconservados a los cuales se unen varios factores de empalme nuclear que participan en la unión de reacciones de empalme. Al cambiar la forma en la que la maquinaria de corte y empalme lee o reconoce los motivos implicados en el procesamiento del pre-ARNm, es posible crear moléculas de ARNm cortado y empalmado diferencialmente. Ahora se ha reconocido que la mayoría de los genes humanos son cortados y empalmados alternativamente durante la expresión del gen normal, aunque los mecanismos implicados no han sido identificados. Bennett et al. (Patente US-6.210.892) describe la modulación antisentido del procesamiento del ARNm celular de tipo silvestre usando análogos de oligonucleótidos antisentido que no inducen la escisión mediada por la ARNasa H del ARN diana. Esto resulta útil para poder generar ARNm cortados y empalmados alternativamente que carecen de exones específicos (por ejemplo, como se describe por (Sazani, Kole, et al. 2007) para la generación de receptores de la superfamilia del TNF solubles que carecen de exones que codifican dominios que se extienden a través de la membrana.

En los casos donde una proteína normalmente funcional se termina prematuramente debido a mutaciones en la misma, un medio para la restauración de cierta producción de proteína funcional a través de la tecnología antisentido ha demostrado ser posible mediante la intervención durante los procesos de corte y empalme, y si se pueden eliminar los exones asociados con mutaciones que causan la enfermedad específicamente de algunos genes, algunas veces se puede producir un producto de proteína acortada que tiene propiedades biológicas similares a la proteína nativa o tiene suficiente actividad biológica para mejorar la enfermedad causada por mutaciones asociadas con el exón (ver por ejemplo, Sierakowska, Sambade et al. 1996; Wilton, Lloyd et al. 1999; van Deutekom, Bremmer-Bout et al. 2001; Lu, Mann et al. 2003; Aartsma-Rus, Janson et al. 2004). Kole et al. (Patentes US-5.627.274; US-5.916.808; US-5.976.879; y US-5.665.593) divulga métodos para combatir el corte y empalme aberrante usando análogos de oligonucleótidos antisentido modificados que no promueven el deterioro del pre-ARNm dirigido. Bennett et al. (Patente US-6.210.892) describe también la modulación antisentido del procesamiento del ARNm celular de tipo silvestre utilizando análogos de oligonucleótidos antisentido que no inducen escisión mediada por la ARNasa H del ARN diana.

El proceso de salto de exón dirigido es probable que sea particularmente útil en genes largos donde hay muchos exones e intrones, donde hay redundancia en la constitución genética de los exones o donde una proteína es capaz de funcionar sin uno o más exones particulares. Los esfuerzos para redirigir el procesamiento génico para el

tratamiento de enfermedades genéticas asociadas con truncamientos causados por mutaciones en varios genes se han enfocado en el uso de oligonucleótidos antisentido que: (1) solapen totalmente o parcialmente con los elementos involucrados en el proceso de corte y empalme; o (2) unan el pre-ARNm en una posición lo suficientemente cercana al elemento para interrumpir la unión y la función de los factores de corte y empalme que normalmente podrían mediar una reacción de empalme particular que se produce en dicho elemento.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es causada por un defecto en la expresión de la proteína distrofina. El gen que codifica la proteína contiene 79 exones dispersos en más de 2 millones de nucleótidos del ADN. Cualquier mutación exónica que cambia el marco de lectura del exón, o introduce un codón de detención, o que se caracteriza por la eliminación de un exón o exones totalmente fuera del marco, o duplicaciones de uno o más exones, tiene el potencial de alterar la producción de distrofina funcional, dando como resultado la DMD.

Se ha determinado que una forma menos severa de distrofia muscular, la distrofia muscular de Becker (BMD) se produce cuando una mutación, normalmente una deleción de uno o más exones, da como resultado un marco de lectura correcto a lo largo de la transcripción de la distrofina entera, de tal modo que traducción del ARNm en la proteína no se termina prematuramente. Si la unión de los exones en dirección 5' y dirección 3' en el procesamiento de un pre-ARNm de distrofina mutado mantiene el marco de lectura correcto del gen, el resultado es un ARNm que codifica una proteína con una eliminación interna corta que retiene cierta actividad, dando como resultado un fenotipo de Becker.

Durante muchos años se ha sabido que las deleciones de un exón o exones que no alteran el marco de lectura de una proteína distrofina daría lugar a un fenotipo BMD, mientras que una deleción del exón que causa un cambio del marco dará lugar a la DMD (Monaco, Bertelson et al. 1988). En general, las mutaciones de distrofina que incluyen mutaciones puntuales y las deleciones del exón que cambian el marco de lectura y así interrumpen la traducción de la proteína apropiada tienen como resultado la DMD. Cabe señalar que algunos pacientes con BMD y DMD tienen deleciones de exón que abarca múltiples exones.

La modulación del corte y empalme del pre-ARNm de la distrofina mutante con oligorribonucleótidos antisentido se descrito tanto *in vitro* como *in vivo* (ver por ejemplo, Matsuo, Masumura et al. 1991; Takeshima, Nishio et al. 1995; Pramono, Takeshima et al. 1996; Dunckley, Eperon et al. 1997; Dunckley, Manoharan et al. 1998; Errington, Mann et al. 2003).

El primer ejemplo de salto de exón específico y reproducible en el modelo de ratón *mdx* fue descrito por Wilton et al. (Wilton, Lloyd et al. 1999). Dirigiendo una molécula antisentido al sitio de corte y empalme del donante, se indujo el salto del exón 23 sistemático y eficiente en el ARNm de la distrofina 6 horas después del tratamiento de las células cultivadas. Wilton et al. también describen el direccionamiento a la región aceptora del pre-ARNm de la distrofina de ratón con oligonucleótidos antisentido más largos. Mientras que el primer oligonucleótido antisentido dirigido al sitio de corte y empalme del donante en el intrón 23 indujo el salto de exón sistemático reducido en mioblastos cultivados primarios, se vio que este compuesto es mucho menos eficiente en cultivos de células inmortalizadas que expresan altos niveles de distrofina. Sin embargo, con una direccionamiento refinado y diseño de oligonucleótidos antisentido, la eficiencia de eliminación del exón específico se incrementó en casi un orden de magnitud (Mann, Honeyman et al. 2002).

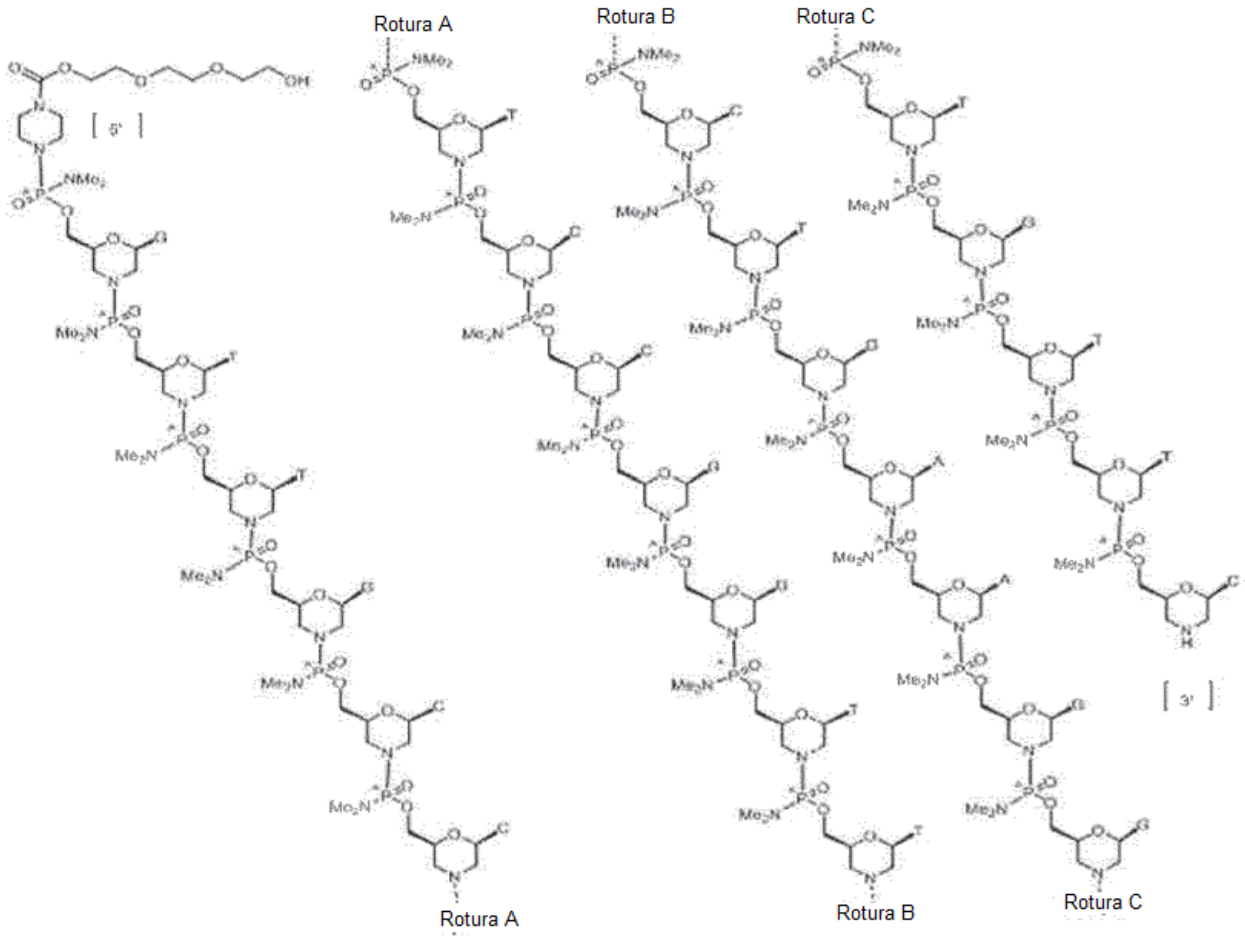
Estudios recientes han comenzado a abordar el desafío de lograr la expresión sostenida de distrofina acompañada por efectos adversos mínimos en los tejidos afectados por la ausencia de distrofina. La inyección intramuscular de un oligonucleótido antisentido dirigido al exón 51 (PR0051) en el músculo tibial anterior en cuatro pacientes con DMD tuvo como resultado saltos específicos del exón 51 sin efectos adversos clínicamente aparentes (Mann, Honeyman et al. 2002; van Deutekom, Janson et al. 2007). En los estudios dirigidos a la administración sistémica de un oligómero de morfolino de fosforodiamidato antisentido conjugado a un péptido de penetración celular (PPMO) dirigido al exón 23 en los ratones *mdx* dieron lugar a una producción sostenida y elevada de proteína distrofina en los músculos esqueléticos y cardiacos sin toxicidad detectable (Jearawiriyapaisarn, Moulton et al. 2008; Wu, Moulton et al. 2008; Yin, Moulton et al. 2008).

Los recientes ensayos clínicos que prueban la seguridad y eficacia de oligonucleótidos de intercambio de corte y empalme (SSO) para el tratamiento de la DMD se basan en tecnología SSO para inducir el corte y empalme alternativo del pre-ARNm por bloqueo estérico del espliceosoma (Cirak et al., 2011; Goemans et al., 2011; Kinali et al., 2009; van Deutekom et al., 2007).

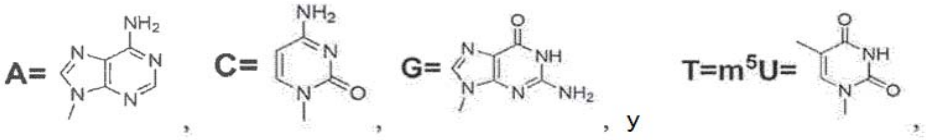
A pesar de estos éxitos, sigue existiendo una necesidad de oligómeros antisentido mejorados dirigidos a múltiples exones de la distrofina y composiciones de administración mejoradas y métodos para aplicaciones terapéuticas para la DMD.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un oligonucleótido antisentido que tiene la siguiente estructura:



en la que



y

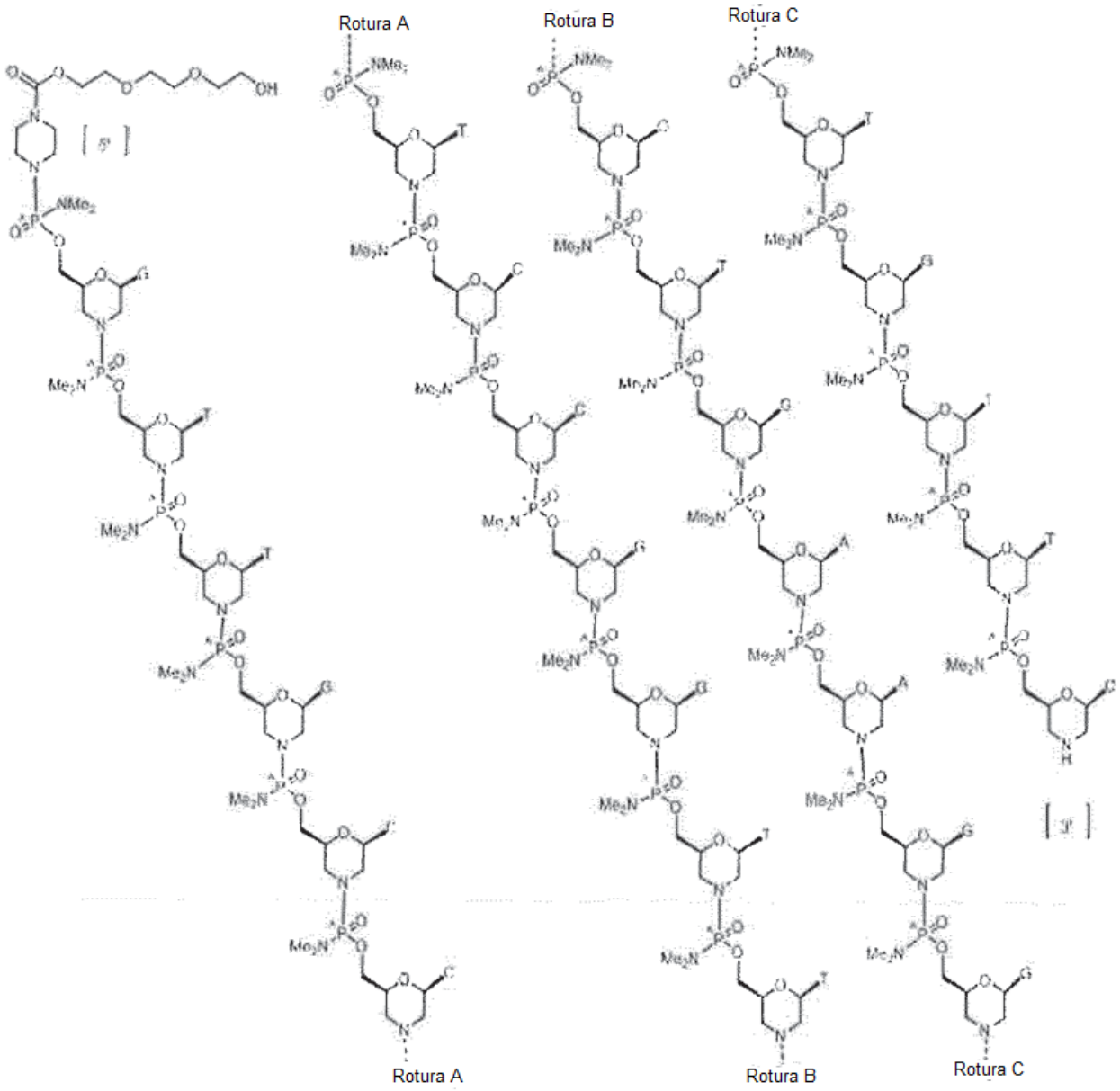
en la que ^ = la estereoquímica del centro de fósforo no está definida; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de acuerdo con la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

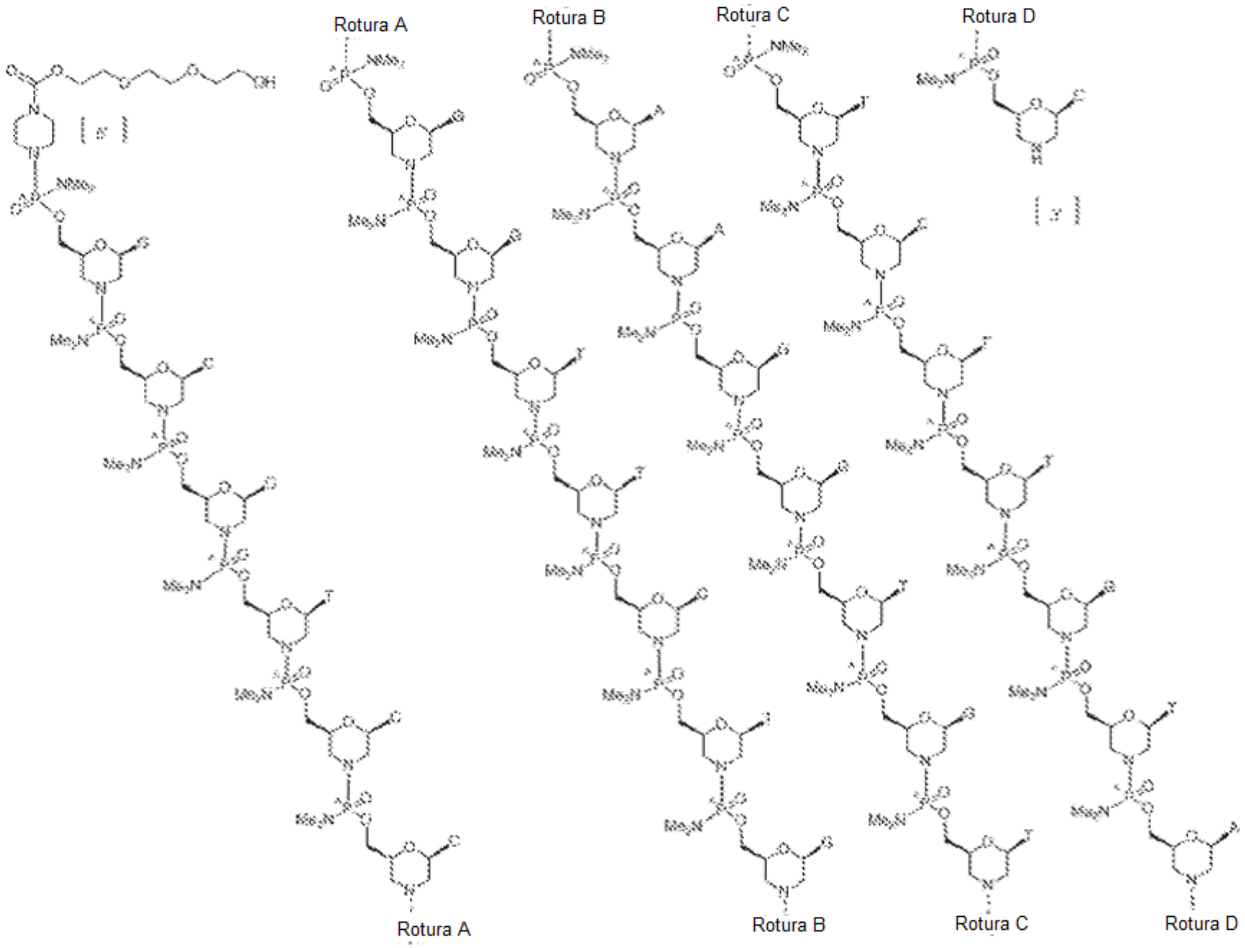
El oligómero antisentido está unido químicamente a una molécula de polietilenglicol.

La invención proporciona un oligómero antisentido, en el que el oligómero tiene la siguiente estructura:

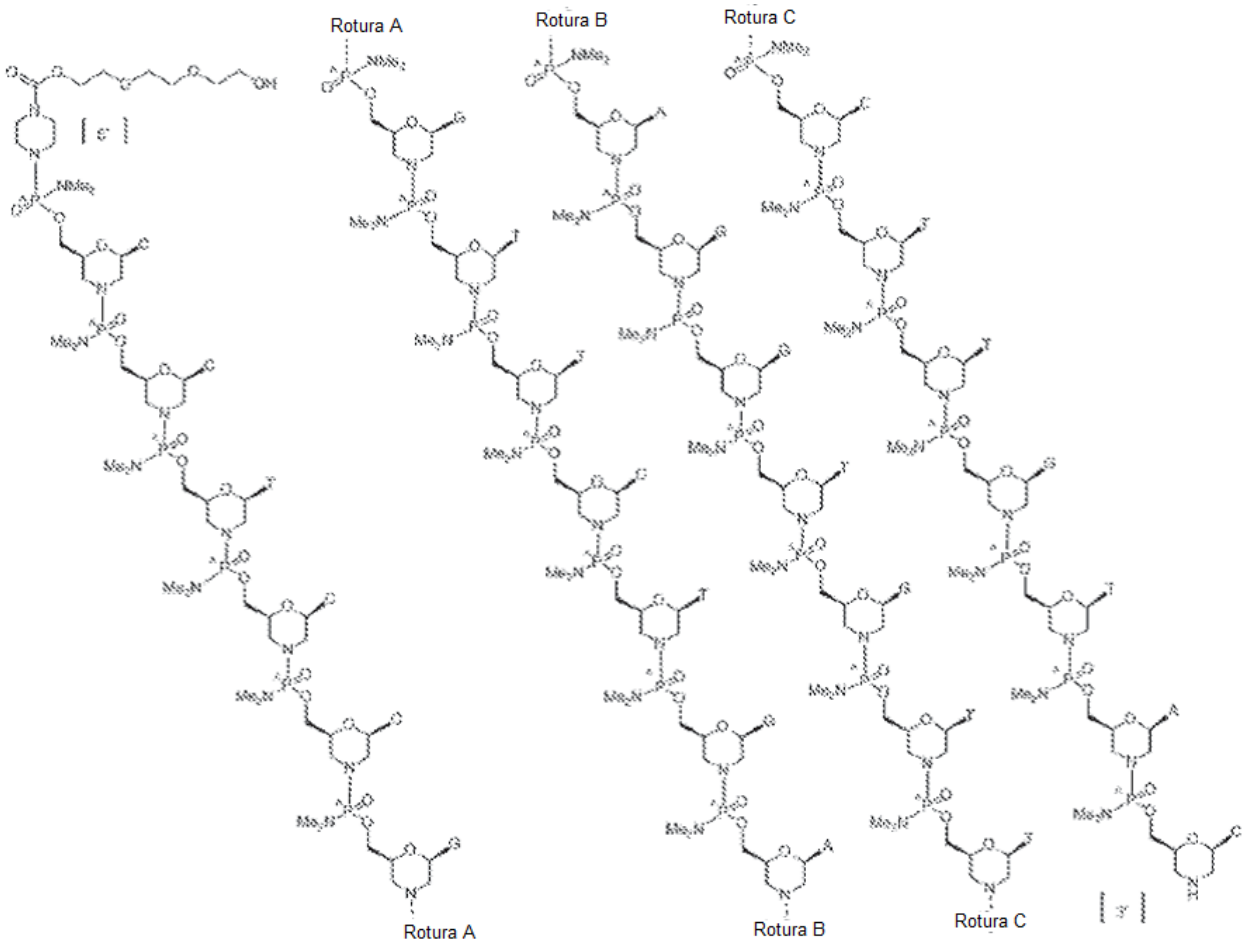


H53A (+36+60).

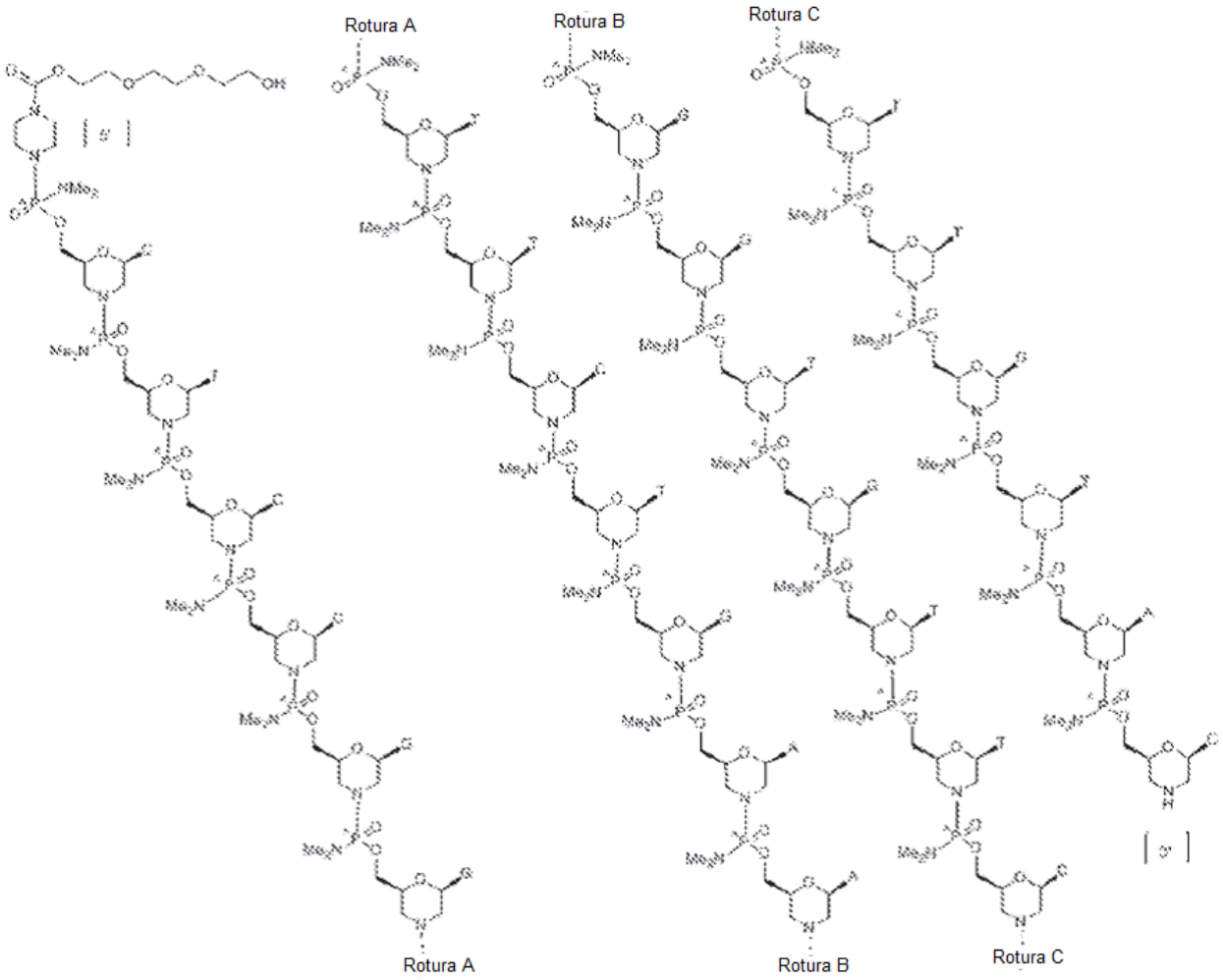
En la presente memoria se divulgan además oligómeros antisentido que tienen las siguientes estructuras:


Rotura A
Rotura B
Rotura C
Rotura D
Rotura A
Rotura B
Rotura C
Rotura D

H53A (+30+57),



H53A (+30+56), y



H53A (+30+55).

De acuerdo con un aspecto, la invención proporciona una molécula antisentido capaz de unirse a una diana seleccionada en el pre-ARNm de la distrofina humana para inducir el salto de exón.

La presente divulgación incluye secuencias antisentido dirigidas al exón 53, identificadas a continuación. H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3' (SEQ ID NO:1).

El oligómero antisentido hibrida específicamente con el sitio de hibridación H53A (+36+60), y tiene la secuencia: SEQ ID NO: 1.

El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la presente invención está unido químicamente a un resto de polietilenglicol.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen los oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la presente invención, y una solución salina que incluye un tampón fosfato.

En otro aspecto, la invención proporciona una molécula antisentido, como se define en la presente memoria para su uso en el tratamiento de un paciente que padece una enfermedad genética en la que existe una mutación en un gen que codifica una proteína particular y el efecto de la mutación puede ser anulado por salto de exón. El tratamiento comprende las etapas de: (a) seleccionar una molécula antisentido de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria; y (b) administrar la molécula a un paciente que necesite tal tratamiento.

En otro aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

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

Breve descripción de las figuras

La Figura 1A muestra una estructura ilustrativa de un oligómero de morfolino con un enlace fosforodiamidato.
La Figura 1B muestra un conjugado de un péptido rico en arginina y un oligómero antisentido.
La Figura 1C muestra un conjugado como en la Figura 1B (no de acuerdo con la invención), en la que los enlaces de la cadena principal contienen uno o más grupos cargados positivamente.
Las Figuras 1D-G muestran el segmento de subunidad de repetición de oligonucleótidos de morfolino ilustrativos, designados de D a G.
Las Figuras 2A-2B representan un esquema de reacción para la preparación de un conector para la síntesis en fase sólida y un soporte sólido para la síntesis de oligómeros.
La Figura 3 representa una gráfica que muestra las actividades relativas de oligómeros antisentido ilustrativos para la inducción del salto del exón 53 en mioblastos primarios cultivados. El ARN aislado de mioblastos primarios tratados con los oligómeros indicados se sometieron a amplificación por RT-PCR anidada específica del exón 53, seguido por electroforesis en gel y cuantificación de la intensidad de banda. Los datos se trazan como % de salto de exón por PCR, es decir, la intensidad de la banda del producto con salto de exón en relación con el producto de PCR de longitud completa.
La Figura 4 representa una gráfica que muestra las actividades relativas de oligómeros antisentido ilustrativos para la inducción del salto del exón 53 en células de rabdomiosarcoma humanas cultivadas. El ARN aislado de células de rabdomiosarcoma tratadas con los oligómeros indicados se sometieron a amplificación por RT-PCR anidada específica del exón 53, seguido por electroforesis en gel y cuantificación de la intensidad de banda. Los datos se trazan como % de salto de exón por PCR, es decir, la intensidad de la banda del producto con salto de exón en relación con el producto de PCR de longitud completa.
Las Figuras 5A-B representan gráficas que muestran las actividades relativas de oligómeros antisentido ilustrativos para la inducción del salto del exón 53 en mioblastos primarios cultivados. El ARN aislado de mioblastos primarios tratados con los oligómeros indicados se sometieron a amplificación por RT-PCR anidada específica del exón 53, seguido por electroforesis en gel y cuantificación de la intensidad de banda. Los datos se trazan como % de salto de exón por PCR, es decir, la intensidad de la banda del producto con salto de exón en relación con el producto de PCR de longitud completa.

Descripción detallada de la invención

Las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a compuestos antisentido mejorados y métodos de uso de los mismos, que están diseñados específicamente para inducir el salto de exón en el gen de la distrofina humana. La distrofina juega un papel vital en la función muscular, y varias enfermedades relacionadas con el músculo se caracterizan por formas mutantes de este gen. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los compuestos antisentido mejorados descritos en la presente memoria inducen el salto de exón en formas mutadas del gen de la distrofina humana, tales como los genes mutados de la distrofina en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD).

Debido a los eventos de corte y empalme aberrante del ARNm causados por mutaciones, estos genes humanos de la distrofina mutados expresan la proteína distrofina defectuosa o no expresan ninguna distrofina medible en absoluto, una condición que conduce a diversas formas de distrofia muscular. Para remediar esta condición, los compuestos antisentido de la presente invención hibridan con regiones seleccionadas de un ARN pre-procesado de un gen de la distrofina humana mutada, inducen el salto del exón y el corte y empalme diferencial que de lo contrario daría lugar a un corte y empalme aberrante del ARNm de la distrofina y así permiten que las células musculares produzcan un transcrito de ARNm que codifica una proteína distrofina funcional. En algunas realizaciones, la proteína distrofina resultante no es necesariamente la forma de “tipo silvestre” de distrofina, sino más bien una forma de distrofina truncada, incluso funcional o semi-funcional.

Incrementando los niveles de proteína distrofina funcional en células musculares, éstas y realizaciones relacionadas son útiles en la profilaxis y el tratamiento de la distrofia muscular, especialmente aquellas formas de distrofia muscular, como DMD y BMD, que se caracterizan por la expresión de proteínas distrofina defectuosas debido al corte y empalme aberrante de ARNm. Los oligómeros específicos descritos en la presente memoria proporcionan el direccionamiento específico al exón de la distrofina respecto a otros oligómeros en uso y ofrecen de este modo ventajas significativas y prácticas sobre métodos alternativos de tratamiento de formas relevantes de distrofia muscular.

El oligómero antisentido divulgado en la presente memoria tiene el listado de secuencias de la SEQ ID NO: 1, que se detalla a continuación:
H53A(+36+60): 5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3' (SEQ ID NO: 1).

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado al comúnmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden usar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen los métodos y materiales preferidos. Para los propósitos de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

I. Definiciones

Por “aproximadamente” se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

Los términos “complementario” y “complementariedad” se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia “T-G-A (5'-3'), es complementaria de la secuencia “T-C-A (5'-3')”. La complementariedad puede ser “parcial”, en la que solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se combinan de acuerdo con las reglas de apareamiento de bases. O, puede ser complementariedad “completa” o “total” entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácido nucleico. Aunque frecuentemente se desea la complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más pero preferiblemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 errores de apareamiento con respecto al ARN diana. Se incluyen las variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En ciertas realizaciones, las variaciones en la secuencia cerca del extremo de un oligómero son generalmente preferibles a las variaciones en el interior, y si están presentes habitualmente están dentro de aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos del extremo 5' y/o 3'.

Las expresiones “péptido de penetración celular” y “CPP” se usan indistintamente y se refieren a péptidos de penetración celular catiónicos, también llamados péptidos de transporte, péptidos vehículo, o dominios de transducción de péptido. Los péptidos, como se muestra en la presente memoria, tienen la capacidad de inducir la penetración celular en el 100 % de las células de una población de cultivo celular dada y permiten la translocación macromolecular dentro de múltiples tejidos *in vivo* tras la administración sistémica. Una realización preferida de CPP es un péptido rico en arginina, como se describe además posteriormente.

Las expresiones “oligómero antisentido” y “compuesto antisentido” y “oligonucleótido antisentido” se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de subunidades cíclicas, llevando cada una un radical de apareamiento de bases, unido por enlaces inter-subunidad que permiten a los radicales de apareamiento de bases hibridarse con la secuencia diana en un ácido nucleico (generalmente un ARN) mediante el apareamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex ácido nucleico: oligómero dentro de la secuencia diana. Las subunidades cíclicas están compuestas de ribosa u otra azúcar pentosa o, en una realización preferida, un grupo morfolino (véase la descripción de oligómeros de morfolino posterior). El oligómero puede tener complementariedad de secuencia exacta o similar a la secuencia diana; las variaciones en la secuencia cercanas al extremo de un oligómero son generalmente preferibles a las variaciones en el interior.

Dicho oligómero antisentido puede diseñarse para bloquear o inhibir la traducción del ARNm o para inhibir el procesamiento de corte y empalme del pre-ARNm natural, y puede decirse que es “dirigido a” o “dirigido contra” una secuencia diana con la que híbrida. La secuencia diana es normalmente una región que incluye un codón de inicio AUG de un ARNm, un oligómero de supresión de traducción, o un sitio de corte y empalme de un ARNm pre-procesado, un oligómero de supresión de corte y empalme (SSO). La secuencia diana para un sitio de corte y empalme puede incluir una secuencia de ARNm que tiene su extremo 5' de 1 a 25 pares de bases en dirección 3' de una unión de aceptador de corte y empalme normal en un ARNm pre-procesado. Una secuencia diana preferida es cualquier región de un ARNm pre-procesado que incluye un sitio de corte y empalme o que está contenida totalmente dentro de una secuencia de codificación de exón o abarca un aceptador de corte y empalme o sitio donador. Generalmente se dice que un oligómero está “dirigido contra” una diana biológicamente relevante, tal como una proteína, virus o bacterias, cuando está dirigido contra el ácido nucleico de la diana de la manera descrita anteriormente.

Los términos “oligómero de morfolino” o “PMO” (oligómero de fosforamidato o fosforodiamidato morfolino) se refieren a un análogo de oligonucleótido compuesto de estructuras de subunidad de morfolino, donde (i) las estructuras están unidas entre sí por enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferiblemente dos átomos de longitud, y preferiblemente son sin carga o catiónicos, que unen el nitrógeno del morfolino de una subunidad a un carbono 5' exocíclico de una subunidad adyacente, y (ii) cada anillo morfolino lleva un radical de apareamiento de bases de purina o pirimidina efectivo para unirse, mediante un enlace de hidrogeno especifico de la base, a una base en un polinucleótido. Véase, por ejemplo, la estructura en la Fórmula I, que muestra un tipo de enlace fosforodiamidato preferido. La expresión “estructura del anillo morfolino” puede usarse indistintamente con la expresión “subunidad de morfolino”. El nitrógeno colgante unido al fósforo está disustituido con metilo. El radical de apareamiento de bases purina o pirimidina es habitualmente adenina, citosina, guanina o timina. La síntesis, estructuras y características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las Patentes de los Estados Unidos números. 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063, 5.506.337, 8.076.476, 8.299.206 y 7.943.762 (enlaces catiónicos). Los enlaces modificados de la inter-subunidad y los grupos terminales están detallados en la solicitud PCT US2011/038459 y en la publicación WO/2011/150408.

Una “subunidad del aminoácido” o “resto aminoácido” puede referirse a un resto de α-aminoácido (-CO-CHR-NH-) o un resto β u otro aminoácido (por ejemplo, -CO-$(CH2)_n$CHR-NH-), donde R es una cadena lateral (que puede incluir hidrógeno) y n es de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4.

La expresión “aminoácidos naturales” se refiere a un aminoácido presente en proteínas que se encuentran en la naturaleza. El término “aminoácidos no naturales” se refiere a aquellos aminoácidos que no está presentes en proteínas que se encuentran en la naturaleza, ejemplos de los cuales incluyen beta-alanina (β-Ala), ácido 6-aminohexanoico (Ahx) y ácido 6-aminopentanoico

Un “exón” se refiere a una sección definida de ácido nucleico que codifica una proteína o una secuencia de ácido nucleico que está representada en la forma madura de una molécula de ARN después de haber eliminado por corte y empalme porciones de un ARN previamente procesado (o precursor). La molécula madura de ARN puede ser un ARN mensajero (ARNm) o una forma funcional de un ARN no codificante, tal como ARNr o ARNt. El gen de la distrofina humana tiene aproximadamente 79 exones.

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

Una “cantidad efectiva” o “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad de compuesto terapéutico, como un oligómero antisentido, administrado a un sujeto mamífero, 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 mediante la inhibición de la traducción o del procesamiento de corte y empalme natural de una secuencia diana seleccionada.

“Salto de exón” se refiere generalmente al proceso por el cual un exón entero o una parte del mismo, se elimina de un determinado ARN previamente procesado y de este modo se excluye su presencia en el ARN maduro, tal como el ARNm maduro que se traduce en una proteína. Por lo tanto, la porción de la proteína que de lo contrario es codificada por el exón saltado no está presente en la forma expresada de la proteína, normalmente creando una forma alterada, aunque todavía funcional, de la proteína. En algunas realizaciones, el exón que se salta es un exón aberrante del gen de la distrofina humana, que puede contener una mutación u otra alteración en su secuencia que de lo contrario causaría un corte y empalme aberrante. En algunas realizaciones, el exón que se salta es uno o más de los exones 1-79 del gen de la distrofina, aunque el exón 53 del gen de la distrofina humana es el preferido.

La “distrofina” es una proteína citoplasmática en forma de barra y una parte vital del complejo proteico que conecta el citoesqueleto de una fibra muscular a la matriz extracelular circundante a través de la membrana celular. La distrofina contiene varios dominios funcionales. Por ejemplo, la distrofina contiene un dominio de unión de actina aproximadamente en los aminoácidos 14-240 y un dominio de barra central aproximadamente en los aminoácidos 253-3040. Este dominio central grande está formado por 24 elementos triple hélice de tipo espectrina de aproximadamente 109 aminoácidos, que tienen homología con la alfa-actinina y la espectrina. Las repeticiones por lo general están interrumpidas por cuatro segmentos de no repetición, ricos en prolina, también conocidos como regiones bisagra. Las repeticiones 15 y 16 están separadas por un tramo de 18 aminoácidos que parece proporcionar un sitio principal para la escisión proteolítica de la distrofina. La identidad de secuencia entre la mayoría de las repeticiones varía entre 10-25 %. Una repetición contiene tres hélices alfa: 1, 2 y 3. Las hélices alfa 1 y 3 están formadas cada una por 7 vueltas de hélice, interactuando probablemente como una bobina en espiral a través de una interfaz hidrófoba. La hélice alfa 2 tiene una estructura más compleja y está formada por segmentos de cuatro y tres vueltas de hélice, separadas por un resto de glicina o prolina. Cada repetición está codificada por dos exones, normalmente interrumpidos por un intrón entre los aminoácidos 47 y 48 en la primera parte de la hélice alfa 2. El otro intrón se encuentra en diferentes posiciones en la repetición, generalmente dispersado en la hélice 3. La distrofina contiene también un dominio rico en cisteína aproximadamente en los aminoácidos 3080-3360), incluyendo un segmento rico en cisteína (es decir, 15 cisteínas en 280 aminoácidos) que muestra homología con el dominio C-terminal de la alfa-actinina del moho del fango (*Dictyostelium discoideum*). El dominio carboxi-terminal se sitúa aproximadamente en los aminoácidos 3361-3685.

El amino terminal de la distrofina se une a la F-actina y el carboxi terminal se une al complejo proteico asociado con distrofina (DAPC) en el sarcolema. El DAPC incluye distroglicanos, sarcoglicanos, integrinas y caveolina, y las mutaciones en cualquiera de estos componentes causan distrofias musculares heredadas de forma autosómica. El DAPC se desestabiliza cuando la distrofina está ausente, lo que se traduce en niveles disminuidos de las proteínas componentes y a su vez conduce al daño progresivo de la fibra y fuga de la membrana. En varias formas de distrofia muscular como la distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD), las células musculares producen una forma alterada y funcionalmente defectuosa de distrofina, o ninguna distrofina, principalmente debido a las mutaciones en la secuencia del gen lo que conduce a un corte y empalme incorrecto. La expresión predominante de la proteína distrofina defectuosa, o la falta completa de distrofina o una proteína tipo distrofina, conduce a una progresión rápida de la degeneración muscular, como se señaló anteriormente. En este sentido, una proteína distrofina “defectuosa” puede caracterizarse por las formas de distrofina que se producen en ciertos sujetos con DMD o BMD, como se conoce en la técnica, o por la ausencia de distrofina detectable.

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

Una proteína distrofina “funcional” se refiere generalmente a una proteína distrofina con suficiente actividad biológica para reducir la degradación progresiva del tejido muscular que es otra característica de la distrofia muscular, por lo general en comparación con la forma alterada o “defectuosa” de la proteína distrofina que está presente en ciertos sujetos con DMD o BMD. En algunas realizaciones, una proteína distrofina funcional puede tener aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % (incluyendo todos los números enteros entre éstos) de la actividad biológica in vitro o in vivo de distrofina de tipo silvestre, medido según técnicas de rutina en la técnica. Por ejemplo, la actividad relacionada con la distrofina en cultivos musculares in vitro pueden medirse según el tamaño de los miotubos, la organización (o desorganización) de las miofibrillas, la actividad contráctil y el agrupamiento espontáneo de receptores de acetilcolina (véase, por ejemplo, Brown et al., Journal of Cell Science. 112:209-216, 1999). Los modelos animales también son recursos valiosos para el estudio de la patogenia de la enfermedad y proporcionan un medio para probar actividades relacionadas con la distrofina. Dos de los modelos animales más utilizados para la investigación de la DMD son el ratón *mdx* y la distrofia muscular en Golden retriever (GRMD), que son negativos para distrofina (véase, por ejemplo, Collins & Morgan, Int J Exp Pathol 84 165-172, 2003). Estos y otros modelos animales pueden utilizarse para medir la actividad funcional de diversas proteínas distrofina. Se incluyen las formas truncadas de distrofina, como aquellas formas que son producidas por algunos de los compuestos antisentido de salto del exón de la presente Invención.

Se entiende por “aislado” el material que substancialmente o esencialmente está exento de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un “polinucleótido aislado” como se usa en la presente memoria, puede referirse a un polinucleótido que ha sido purificado o eliminado de las secuencias que lo flanquean en estado natural, por ejemplo, un fragmento de ADN que ha sido eliminado de las secuencias que están normalmente adyacentes al fragmento.

Como se utiliza en la presente memoria, “longitud suficiente” se refiere a un oligonucleótido antisentido que es complementario a por lo menos 8, más normalmente 8-30, nucleobases contiguas un pre-ARNm de distrofina diana.

Por “mejora” o “que mejora”, o “aumento” o “que aumenta”, o “estimula” o “que estimula”, se refiere generalmente a la capacidad de uno o más compuestos o composiciones antisentido para producir o causar una mayor respuesta fisiológica (es decir, efectos aguas abajo) en una célula o un sujeto, en comparación con la respuesta causada por un compuesto no antisentido o un compuesto control. Una respuesta fisiológica medible puede incluir aumento de la expresión de una forma funcional de una proteína distrofina, o mayor actividad biológica relacionada con la distrofina en el tejido muscular, entre otras respuestas aparentes del conocimiento de la técnica y la descripción en el presente memoria. El aumento de la función muscular puede también medirse, incluyendo los aumentos o mejoras en la función muscular en aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %. El porcentaje de fibras musculares que expresan una distrofina funcional también puede ser medido, incluyendo la expresión de distrofina aumentada en aproximadamente 1 %, 2 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de las fibras musculares. Por ejemplo, se ha demostrado que aproximadamente el 40 % de mejora de la fundón muscular puede ocurrir si el 25-30 % de fibras expresan distrofina (véase, por ejemplo, DelloRusso et al, Proc Natl Acad Sci USA 99: 12979-12984, 2002). Una cantidad “incrementada” o “aumentada” es normalmente una cantidad “estadísticamente significativa” y pueden incluir un aumento que es de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces (por ejemplo, 500, 1.000 veces) (incluyendo todos los números enteros y puntos decimales entre éstos y por encima de 1), por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por un compuesto no antisentido (la ausencia de un agente) o un compuesto control.

El término “reduce” o “inhibe” puede referirse generalmente a la capacidad de uno o más compuestos antisentido de la invención PARA “disminuir” una respuesta celular o fisiológica relevante, como un síntoma de una enfermedad o afección descritas en la presente memoria, medido de acuerdo con las técnicas habituales en la técnica de diagnóstico. Respuestas fisiológicas o celulares relevantes (*in vivo* o *in vitro*) serán evidentes los expertos en la materia y pueden incluir reducciones en los síntomas de la patología de distrofia muscular o reducción en la expresión de las formas defectuosas de distrofina, como las formas alteradas de distrofina que se expresan en personas con DMD o BMD. Una “disminución” en una respuesta puede ser estadísticamente significativa en comparación con la respuesta producida por un compuesto no antisentido o una composición de control y puede incluir un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % , 95 % o 100 % de disminución, incluyendo todos los números enteros entre éstos.

“Tratamiento” de un individuo (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención utilizada en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula. El tratamiento incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica, y puede ser realizado profilácticamente o posterior a la iniciación de un evento patológico o contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o patología de una enfermedad o afección asociadas con la proteína distrofina, como en ciertas formas de distrofia muscular, y puede incluir, por ejemplo, cambios o mejoras mínimos en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección a tratar. También se incluyen tratamientos “profilácticos”, que pueden ser dirigidos a la reducción de la velocidad de progresión de la enfermedad o afección a tratar, retrasar el

comienzo de esa enfermedad o afección, o reducir la severidad de su comienzo. “Tratamiento” o “profilaxis” no indica necesariamente la erradicación completa, cura, o prevención de la enfermedad o condición, o sus síntomas asociados.

Un “sujeto”, como se usa en la presente memoria, incluye cualquier animal que exhibe un síntoma, o está en riesgo de exhibir un síntoma, que puede ser tratado con un compuesto antisentido de la invención, tal como un sujeto que tiene o está en riesgo de tener DMD o BMD, o cualquiera de los síntomas asociados con estas afecciones (por ejemplo, pérdida de fibra muscular). Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (por ejemplo, ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tal como un gato o un perro). Los primates no humanos y, preferiblemente, los pacientes humanos, están incluidos.

“Alquilo” o “alquileno” se refieren a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada saturado que contiene de 1 a 18 carbonos. Los ejemplos incluyen sin limitación, metilo, etilo, propilo, iso-propilo, butilo, iso-butilo, terc-butilo, n-pentilo y n-hexilo. La expresión “alquilo inferior” se refiere a un grupo alquilo, como se define en la presente memoria, que contiene entre 1 y 8 carbonos.

“Alquenilo” se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada insaturado que contiene de 2 a 18 carbonos y que comprende al menos un enlace doble de carbono-carbono. Los ejemplos incluyen sin limitación etenilo, propenilo, iso-propenilo, butenilo, iso-butenilo, terc-butenilo, n-pentenilo y n-hexenilo. La expresión “alquenilo inferior” se refiere a un grupo alquenilo, como se define en la presente memoria, que contiene entre 2 y 8 carbonos.

“Alquinilo” se refiere a un radical hidrocarburo de cadena lineal o ramificada insaturado que contiene de 2 a 18 carbonos que comprende al menos un enlace triple carbono-carbono. Los ejemplos incluyen sin limitación etinilo, propinilo, iso-propinilo, butinilo, iso-butinilo, terc-butinilo, pentinilo y hexinilo. La expresión “alquinilo inferior” se refiere a un grupo alquinilo, como se define en la presente memoria, que contiene entre 2 y 8 carbonos.

“Cicloalquilo” se refiere a un radical alquilo mono o poli-cíclico. Los ejemplos incluyen sin limitación ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo.

“Arilo” se refiere a un radical hidrocarburo aromático cíclico que contiene 18 carbonos que tienen uno o más anillos cerrados. Los ejemplos incluyen sin limitación fenilo, bencilo, naftilo, antracenilo, fenantracenilo y bifenilo.

“Aralquilo” se refiere a un radical de la fórmula RaRb donde Ra es una cadena de alquileno según lo definido anteriormente y Rb es uno o más radicales arilo según lo definido anteriormente, por ejemplo, bencilo, difenilmetilo y similares.

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

“Alcoxi” se refiere a un radical de fórmula -ORda donde Rd es un radical alquilo tal como se define en la presente memoria. La expresión “alcoxi inferior” se refiere a un grupo alcoxi, tal como se define en la presente memoria, que contiene entre 1 y 8 carbonos. Los ejemplos de grupos alcoxi incluyen, sin limitación, metoxi y etoxi.

“Alcoxialquilo” se refiere a un grupo alquilo sustituido con un grupo alcoxi.

“Carbonilo” se refiere al radical C(=O)-.

“Guanidinilo” se refiere al radical $H_2N(C=NH_2)$-NH-.

“Amidinilo” se refiere al radical $H_2N(C=NH_2)CH$-.

“Amino” se refiere al radical NH_2.

“Alquilamino” se refiere a un radical de la fórmula -NHRd o -NRdRd donde cada Rd es, independientemente, un radical alquilo tal como se define en la presente memoria. La expresión “alquilamino inferior” se refiere a un grupo alquilamino, como se define en la presente memoria, que contiene entre 1 y 8 carbonos.

“Heterociclo” significa un anillo heterocíclico, monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 7 a 10 miembros que es saturado, insaturado o aromático, y que contiene de 1 a 4 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno pueden estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en los cuales cualquiera de los heterociclos anteriores están fusionados con un anillo de benceno. El heterociclo puede estar a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos como se define más adelante. Así, además de los heteroarilos citados a continuación, los heterociclos también incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo,

tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.

"Heteroarilo" significa un anillo heterociclo aromático de 5 a 10 miembros y que tiene al menos un heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno y azufre y que contiene al menos 1 átomo de carbono, que incluye sistemas de anillo mono- y bicíclicos. Los heteroarilos representativos son piridilo, furilo, benzofuranilo, tiofenilo, benzotiofenilo, quinolinilo, pirrolilo, indolilo, oxazolilo, benzoxazolilo, imidazolilo, benzimidazolilo, tiazolilo, benzotiazolilo, isoxazolilo, pirazolilo, isotiazolilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, triazinilo, cinolinilo, ftalazinilo y quinazolinilo.

Las expresiones "alquilo opcionalmente sustituido", "alquenilo opcionalmente sustituido", "alcoxi opcionalmente sustituido", "tioalcoxi opcionalmente sustituido", "alquiloamino opcionalmente sustituido", "alquilo inferior opcionalmente sustituido", "alquenilo inferior opcionalmente sustituido", "alcoxi inferior opcionalmente sustituido ", "tioalcoxi inferior opcionalmente sustituido", "alquilamino inferior opcionalmente sustituido" y "heterociclilo opcionalmente sustituido" significan que, cuando está sustituido, al menos un átomo de hidrógeno es reemplazado con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O) se reemplazan dos átomos de hidrógeno. En este sentido, los sustituyentes incluyen: deuterio, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido, cicloalquilo opcionalmente sustituido, oxo, halógeno, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, $NRxSO_2Ry$, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOmRx y -SOmNRxRy, en la que m es 0, 1 o 2, Rx y Ry son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido o cicloalquilo opcionalmente sustituido y cada uno de dicho alquilo opcionalmente sustituido, alquenilo opcionalmente sustituido, alquinilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido, heterociclo opcionalmente sustituido y sustituyentes cicloalquilo opcionalmente sustituidos pueden sustituirse además con uno o más de oxo, halógeno, -CN, -ORx, NRxRy, NRxC(=O)Ry, NRxSO2Ry, -NRxC(=O)NRxRy, C(=O)Rx, C(=O)ORx, C(=O)NRxRy, -SOmRx y -SOmNRxRy.

Un sistema de nomenclatura de molécula antisentido se propuso y se publicó para distinguir entre las diferentes moléculas antisentido (véase Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Esta nomenclatura se convirtió en especialmente relevante a la hora de probar varias moléculas antisentido ligeramente diferentes, todas dirigidas contra la misma región diana, como se muestra posteriormente:
H#A/D(x:y).

La primera letra señala la especie (por ejemplo H: humano, M: murino, C: canino). "#" señala el número de exón de la distrofina diana. "A/D" indica el sitio de corte y empalme del aceptor o donante al principio y al final del exón, respectivamente, (x y) representan las coordenadas de hibridación donde "-" o "+" indican secuencias intrónicas o exónicas respectivamente. Por ejemplo, A(-6+18) indicaría las últimas 6 bases del intrón que precede al exón diana y las primeras 18 bases del exón diana. El sitio de corte y empalme más cercano sería el aceptador de modo que estas coordenadas irían precedidas de una "A". La descripción de las coordenadas de hibridación en el sitio de corte y empalme del donador podrían ser D(+2-18) donde las 2 últimas bases exónicas y las 18 primeras bases intrónicas corresponden al sitio de hibridación de la molécula antisentido. Las coordenadas de hibridación totalmente exónicas estarían representadas por A(+65+85), es decir, el sitio entre el nucleótido 65 y el nucleótido 85 desde el inicio de este exón.

II. Oligonucleótidos antisentido

Cuando la molécula o moléculas antisentido están dirigidas a secuencias de nucleótidos implicadas en el corte y empalme de los exones dentro de las secuencias del pre-ARNm, el corte y empalme normal del exón se puede inhibir, lo que provoca que la maquinaria de corte y empalme evite el exón dirigido total del ARNm maduro. En muchos genes, la deleción de un exón entero llevaría a la producción de una proteína no funcional a través de la pérdida de importantes dominios funcionales o la interrupción del marco de lectura. En algunas proteínas, sin embargo, es posible acortar la proteína mediante la deleción de uno o más exones dentro de la proteína, sin alterar el marco de lectura, y sin alterar gravemente la actividad biológica de la proteína. Normalmente, dichas proteínas tienen una función estructural y/o poseen dominios funcionales en sus extremos. La distrofia muscular de Duchenne se debe a mutaciones que impiden la síntesis de un producto del gen de la distrofina funcional, por lo general alterando el marco de lectura. Los oligonucleótidos antisentido que inducen un salto de exón de la región del gen de la distrofina que contiene la mutación pueden permitir que las células musculares produzcan una transcripción de ARNm maduro que codifica la proteína distrofina funcional. La proteína distrofina resultante no es necesariamente de la forma "tipo silvestre" de distrofina, sino que es una forma truncada, incluso funcional o semi-funcional de distrofina. La presente invención describe moléculas antisentido capaces de unirse a las dianas del pre-ARNm de la distrofina especificadas en el exón 53, y redireccionar el procesamiento de este gen.

El oligonucleótido antisentido y el ARN diana son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes de cada molécula está ocupado por nucleótidos que pueden unir hidrógeno entre sí, de tal forma que se produce la unión estable y específica entre el oligonucleótido y la diana. Así, "específicamente

hibridizable" y "complementarlo" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o apareamiento exacto de tal forma que se produce la unión estable y específica entre el oligonucleótido y el objetivo. Se sabe en la técnica que la secuencia de una molécula antisentido no necesita ser 100 % complementaria con la de su secuencia diana para ser específicamente hibridizable. Una molécula antisentido es específicamente hibridizable cuando la unión del oligonucleótido a la molécula diana interfiere con la función normal del ARN diana, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido antisentido a secuencias no diana en las condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de los ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

La deleción del exón no debe conducir a un cambio del marco de lectura en el ARNm transcrito acortado. Así, si en una secuencia lineal de tres exones el extremo del primer exón codifica dos de tres nucleótidos en un codón y el siguiente exón se elimina, entonces el tercer exón en la secuencia lineal debe iniciarse con un nucleótido único que sea capaz de completar el triplete de nucleótidos para un codón. Si el tercer exón no comienza con un nucleótido único, se producirá un cambio de marco de lectura que podría conducir a la generación de una proteína no funcional o truncada.

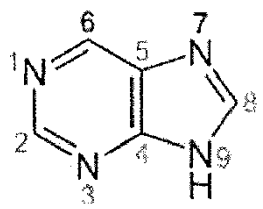
Se apreciará que las reordenaciones del codón en el extremo de los exones en proteínas estructurales no siempre pueden romperse al final de un codón, por lo tanto puede ser necesario eliminar más de un exón del pre-ARNm para asegurar la lectura en el marco del ARNm. En dichas circunstancias, puede ser necesario seleccionar una pluralidad de oligonucleótidos antisentido por el método de la invención en el que cada uno se dirige a una región diferente responsable de inducir el corte y empalme de los exones que se eliminarán.

Para evitar la degradación del pre-ARNm durante la formación del dúplex con las moléculas antisentido, las moléculas antisentido se pueden adaptar para minimizar o prevenir la escisión por la ARNasa H endógena. Esta propiedad es muy preferida ya que el tratamiento del ARN con los oligonucleótidos no metilados ya sea intracelularmente o en extractos crudos que contienen ARNasa H conduce a la degradación del pre-ARNm: dúplex de oligonucleótidos antisentido. Un ejemplo de moléculas antisentido que cuando forman dúplex con el ARN no son escindidas por la ARNasa H celular son los derivados de 2'-O-metilo. Los oligorribonucleotidos 2'-O-metilo son muy estables en un ambiente celular y en los tejidos animales, y sus dúplex con el ARN tienen valores de Tm más altos que sus contrapartes ribo o dexosirribo. La metilación de la posición 2' hidroxirribosa y la incorporación de una cadena principal de fosfotioato son una estrategia común para producir moléculas que se asemejan superficialmente al ARN pero que son mucho más resistentes a la degradación de la nucleasa.

Las moléculas antisentido que no activan la ARNasa H se pueden preparar de acuerdo con técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Patente US-5.149.797). Dichas moléculas antisentido, que pueden ser secuencias de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, simplemente contienen cualquier modificación estructural que dificulta o impide estéricamente la unión de la ARNasa H a una molécula dúplex que contiene el oligonucleótido como su miembro, modificación estructural que no dificulta substancialmente ni interrumpe la formación del dúplex. Debido a que las porciones del oligonucleótido involucradas en la formación del dúplex son sustancialmente diferentes de aquellas porciones involucradas en la unión de la ARNasa H a estas, existen numerosas moléculas antisentido que no activan la ARNasa H. Por ejemplo, dichas moléculas antisentido pueden ser oligonucleótidos en los que al menos uno, o todos, de los restos de fosfato con puente internucleótido son fosfatos modificados, tales como metil fosfonatos, metil fosforotioatos, fosforomorfolatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos. Por ejemplo, cualquiera de uno de los restos de fosfato con puente internucleótido se puede modificar como se describe. En otro ejemplo no limitante, dichas moléculas antisentido son moléculas en las que al menos uno, o todos, de los nucleótidos contienen un radical alquilo inferior 2' (por ejemplo, alquilo saturado o insaturado, lineal o ramificado de C_1-C_4, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, cualquiera de los nucleótidos puede ser modificado como se describe.

Los oligonucleótidos pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobase (referida a menudo en la técnica simplemente como "base").

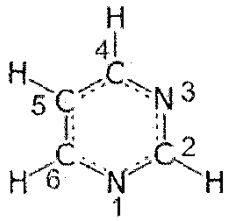
Las bases de purina comprenden un anillo de pirimidina condensado con un anillo de imidazol, como se describe en la fórmula general:



Purina

La adenina y la guanina son las dos nucleobases de purina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos

Las bases de pirimidina comprenden un anillo de pirimidina de seis miembros como se describe en la fórmula general:



Pirimidina

La citosina, el uracilo y la timina son las bases de pirimidina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos.

El oligonucleótido antisentido está unido químicamente a un resto que mejora la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. El resto es una cadena de polietilenglicol.

Las moléculas antisentido utilizadas de acuerdo con esta invención pueden producirse convenientemente y rutinariamente mediante la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis se puede adquirir en varios proveedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, California). Un método para sintetizar los oligonucleótidos en un soporte sólido modificado se describen en la Patente US-4.458.066.

Se puede emplear adicionalmente o como alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tal como los fosforotioatos y derivados alquilados. En una realización automatizada de este tipo, se utilizan dietil-fosforamiditas como materiales de partida y pueden sintetizarse como se describe por Beaucage, et al., (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862.

Las moléculas antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico. Las moléculas de la invención también pueden ser mezcladas, encapsuladas, conjugadas o asociadas de otra manera con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas al receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para favorecer la absorción, distribución y/o absorción

A. Oligómeros de morfolino

Los oligómeros de morfolino que tienen enlaces en la cadena principal que contienen fósforo se ilustran en las Figuras 1A-1C. Un oligómero de morfolino unido a fosforodiamidato tal como se muestra en la Figura 1C, está modificado para contener grupos cargados positivamente en preferiblemente 10 % -50 % de sus enlaces de la cadena principal. Los oligómeros de morfolino con enlaces en la cadena principal no cargados, incluidos los oligonucleótidos antisentido, se detallan, por ejemplo, en (Summerton y Weller 1997) y en las patentes de los Estados Unidos de propiedad conjunta Números 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.521.063, 5.506.337, 8.076.476, 8.299.206 y 7.943.762. Los oligómeros de morfolino con enlaces modificados que incluyen enlaces cargados se pueden encontrar en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º: 2012/0065169.

Las propiedades importantes de las subunidades basadas en morfolino incluyen: 1) la capacidad de unirse en forma oligomérica mediante enlaces en la cadena principal estables, cargados positivamente o no cargados; 2) la capacidad para soportar una base de nucleótido (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e inosina) de tal forma que el polímero formado se puede hibridar con un ácido nucleico diana de base complementaria, incluyendo ARN diana, valores de Tm superiores a aproximadamente 45 °C en oligonucleótidos relativamente cortos (por ejemplo, 10-15 bases); 3) la capacidad del oligonucleótido para transportarse activamente o pasivamente en células de mamíferos; y 4) la capacidad del heterodúplex ARN:oligonucleótido antisentido para resistir la degradación de la ARNasa y la ARNasa H, respectivamente.

Las estructuras de la cadena principal ilustrativas de los oligonucleótidos antisentido de la materia objeto reivindicada incluyen los tipos de subunidad de morfolino mostrados en las Figuras 1D-G, cada una unida por un enlace por un enlace de subunidad que contiene fósforo, cargado positivamente o no cargado. La Figura 1D muestra un enlace que contiene fósforo que forma la cadena principal con unidad repetitiva de cinco átomos, donde los anillos de morfolino están unidos por un enlace de fosfoamida de 1 átomo. La Figura 1E muestra un enlace que produce una cadena principal con unidad repetitiva de 6 átomos. En esta estructura, el átomo Y que enlaza el carbono 5' morfolino con el grupo de fósforo puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferentemente, oxígeno. El

radical X colgante del fósforo puede ser flúor, un alquilo o alquilo sustituido, un alcoxi o alcoxi sustituido, un tioalcoxi o tioalcoxi sustituido, o nitrógeno no sustituido, monosustituido, o disustituido, que incluyen estructuras cíclicas, tales como morfolinas o piperidinas. Alquilo, alcoxi y tioalcoxi incluyen preferiblemente 1-6 átomos de carbono. Los radicales Z son azufre u oxígeno, y son preferiblemente oxígeno.

Los enlaces que se muestran en las Figuras 1F y 1G están diseñados para cadenas principales de longitud unitaria de 7 átomos. En la estructura IF, el radical X es como en la estructura IE, y el radical Y puede ser metileno, azufre, o, preferiblemente, oxígeno. En la Estructura 1G, los radicales X e Y son como en la Estructura IE. Los oligonucleótidos morfolino particularmente preferidos incluyen aquellos compuestos de estructuras de subunidad de morfolino de la forma que se muestra en la Figura IE, donde X = NH_2, $N(CH_3)_2$ o 1-piperazina u otro grupo cargado, Y=O y Z=O.

Un oligonucleótido sustancialmente no cargado puede modificarse, de acuerdo con un aspecto de la invención, para incluir enlaces cargados, por ejemplo, hasta aproximadamente 1 por cada 2-5 enlaces no cargados, tal como aproximadamente 4-5 por cada 10 enlaces no cargados. En ciertas realizaciones, la mejora óptima en la actividad antisentido puede ser observada cuando aproximadamente 25 % de los enlaces de la cadena principal son catiónicos. En ciertas realizaciones, la mejora puede observarse con un pequeño número por ejemplo, 10-20 % de enlaces catiónicos, o donde el número de enlaces catiónicos está en el intervalo de 50-80 %, tal como aproximadamente 60 %.

Se proporcionan oligómeros que tienen cualquier número de enlaces catiónicos, incluyendo oligómeros enlazados completamente catiónicos. Preferiblemente, sin embargo, los oligómeros están parcialmente cargados, y tienen, por ejemplo, 10 %-80 %. En realizaciones preferidas, aproximadamente de 10 % a 60 %, y preferiblemente de 20 a 50 % de los enlaces son catiónicos.

En una realización, los enlaces catiónicos se entremezclan a lo largo de la cadena principal. Los oligómeros parcialmente cargados preferiblemente contienen por lo menos dos enlaces no cargados consecutivos; es decir, el oligómero preferiblemente no tiene un patrón estrictamente alternante a lo largo de toda su longitud.

También se consideran los oligómeros que tienen bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces no cargados; por ejemplo, un bloque central de enlaces no cargados puede estar flanqueado por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene regiones 5', 3' y centrales de una longitud aproximadamente igual, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región central es mayor de aproximadamente 50 %, preferiblemente mayor de aproximadamente 70 %.

En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido pueden prepararse mediante síntesis en fase sólida gradual, que emplean métodos detallados en las referencias citadas anteriormente, y posteriormente con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla de enlaces de la cadena principal catiónicos y no cargados. En algunos casos, puede ser deseable añadir radicales químicos adicionales al compuesto antisentido, por ejemplo, para mejorar la farmacocinética o para facilitar la captura o detección del compuesto. Dicho radical puede unirse covalentemente, de acuerdo con métodos sintéticos estándar. Por ejemplo, la adición de un radical de polietilenglicol o de otro polímero hidrófilo, por ejemplo, uno que tiene 1-100 subunidades monoméricas, puede ser útil para aumentar la solubilidad.

Un radical indicador, tal como la fluoresceína o un grupo radiomarcado, puede unirse para fines de detección. Como alternativa, el marcador indicador unido al oligómero puede ser un ligando, tal como un antígeno o biotina, capaz de unir un anticuerpo marcado o estreptavidina. Al seleccionar un radical para la unión o modificación de un compuesto antisentido, se desea generalmente por supuesto seleccionar compuestos químicos de grupos que sean biocompatibles y que probablemente sean tolerados por un sujeto sin efectos secundarios indeseables.

Cada estructura de anillo morfolino soporta un radical de apareamiento de bases, para formar una secuencia de radicales de apareamiento de bases que se diseña normalmente para hibridar con una diana antisentido seleccionada en una célula o en un sujeto a tratar. El radical de apareamiento de bases puede ser una purina o pirimidina que exista en el ADN o ARN nativo (por ejemplo, A, G, C, T o U).

III. Formulaciones y modos de administración

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona formulaciones o composiciones adecuadas para la administración terapéutica de oligómeros antisentido de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los oligómeros de acuerdo con la presente invención, formulados conjuntamente con uno o más vehículos (aditivos) y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Aunque es posible que un oligómero de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

Los métodos para la administración de moléculas de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio., 2:139; and Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar; Sullivan et al., PCT WO 94/02595. Estos y otros protocolos pueden ser utilizados para la administración de prácticamente cualquier molécula de ácido nucleico, incluyendo los oligómeros aislados de la presente invención.

Como se detalla a continuación, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser especialmente formuladas para la administración en forma sólida o líquida, incluyendo las adaptadas para lo siguiente: (1) administración oral, por ejemplo, soluciones orales (soluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, los destinados a la absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para su uso en la lengua; (2) administración parenteral, por ejemplo, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa o inyección epidural como, por ejemplo, una solución estéril o suspensión o formulación de liberación sostenida; (3) aplicación tópica, por ejemplo, como una crema, pomada, o un parche de liberación controlada o aerosol aplicado sobre la piel; (4) por vía vaginal o intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; (5) por vía sublingual; (6) ocular; (7) vía transdérmica; o (8) por vía nasal.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se utiliza en la presente memoria para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que están dentro del alcance del criterio médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de los seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, reacción alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación razonable de riesgo-beneficio.

La frase “vehículo farmacéuticamente aceptable” como se usa en la presente memoria se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, auxiliar de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o zinc o ácido estérico) o material que encapsula el disolvente, implicado en llevar o transportar el compuesto en cuestión de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente.

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

Otros ejemplos no limitantes de agentes adecuados para la formulación con los oligómeros antisentido de la presente invención incluyen: ácidos nucleicos conjugados con PEG, ácidos nucleicos conjugados con fosfolípidos, ácidos nucleicos que contienen radicales lipófilos, fosforotioatos, inhibidores de la P-glicoproteína (como Pluronic P85) que pueden potenciar la entrada de fármacos en varios tejidos; polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(DL-láctido-coglicólido) para la administración de liberación sostenida después de la implantación (Emerich, D F et al., 1999, Cell Transplant, 8, 47-58) Alkermes, Inc. Cambridge, Mass.; y nanopartículas cargadas, como las fabricadas de polibutilcianoacrilato, que pueden administrar medicamentos a través de la barrera hematoencefálica y pueden alterar los mecanismos de captación neuronal (Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 23, 941-949, 1999).

La invención también incluye el uso de la composición farmacéutica que comprende liposomas de superficie modificada que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (modificado con PEG, ramificado y no ramificado o combinaciones de los mismos, o liposomas de circulación prolongada o liposomas stealth). Los oligómeros para uso en la invención pueden comprender también de moléculas de PEG unidas covalentemente de varios pesos moleculares. Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de medicamentos en los tejidos diana. Esta clase de vehículos de fármacos resiste la opsonización y la eliminación por el sistema mononuclear fagocítico (MPS o RES), permitiendo así tiempos de circulación en la sangre más prolongados y mayor exposición en el tejido para el fármaco encapsulado (Lasic et al. Chem. Rev. 1995, 95, 2601-2627; Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 1995, 43, 1005-1011). Estos liposomas han demostrado que se acumulan selectivamente en los tumores, probablemente por extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic et al., Science 1995, 267, 1275-1276; Oku et al., 1995, Biochim. Biophys. Acta, 1238, 86-90). Los liposomas de circulación prolongada mejoran la farmacocinética y farmacodinamia del ADN y ARN, especialmente en comparación con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en los tejidos del MPS (Liu et al., J. Biol. Chem. 1995, 42, 24864-24870; Choi et al., Publicación Internacional PCT N.º WO 96/10391; Ansell et al., Publicación Internacional PCT N.º WO 96/10390; Holland et al., Publicación Internacional PCT N.º WO 96/10392). Los liposomas de circulación prolongada también protegen a los medicamentos de la degradación por nucleasas en un mayor

grado en comparación con los liposomas catiónicos, basado en su capacidad para evitar la acumulación en los tejidos metabólicamente agresivos de MPS como el hígado y el bazo.

En una realización adicional, la presente invención incluye composiciones farmacéuticas de oligómero preparadas para la administración como se describe en las Patentes de Estados Unidos Números 6.692.911. 7.163.695 y 7.070.807. En este sentido, en una realización, la presente invención proporciona un oligómero de la presente invención en una composición que comprende copolímeros de lisina e histidina (HK) (como se describe en las Patentes de Estados Unidos Números 7.163.695, 7.070.807 y 6.692.911) solos o en combinación con PEG (por ejemplo, PEG ramificado o no ramificado o una mezcla de ambos), en combinación con PEG y un radical de direccionamiento o cualquiera de los anteriores en combinación con un agente reticulante. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligómeros antisentido en composiciones que comprenden polihistidina modificada con ácido glucónico o polihistidina gluconilada/transferrina-polilisina. Un experto en la materia también reconoce que se pueden sustituir los aminoácidos con propiedades similares a His y Lys dentro de la composición.

Ciertas realizaciones de los oligómeros de acuerdo con la invención pueden contener un grupo funcional básico, tales como amino o alquilamino y son, por lo tanto, capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con ácidos farmacéuticamente aceptables. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” a este respecto se refiere a las sales de adición de ácido inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse in situ en el vehículo de administración o en el proceso de fabricación de la forma farmacéutica, o por la reacción por separado de un compuesto purificado de la invención en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico aislado y aislando la sal formada durante la purificación posterior. Las sales representativas incluyen las sales bromhidrato, clorhidrato, sulfato, bisulfato, fosfato, nitrato, acetato, valerato, oleato, palmitato, estearato, laurato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al. (1977) “Pharmaceutical Salts”, J. Pharm. Sci. 66:1-19).

Las sales farmacéuticamente aceptables de los oligómeros de acuerdo con la presente invención incluyen las sales no tóxicas convencionales o sales de amonio cuaternario de los compuestos, por ejemplo, de ácidos orgánicos o inorgánicos no tóxicos. Por ejemplo, sales convencionales no tóxicas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, palmítico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxi-benzoico, fumárico, toluenosulfónico metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isotiónico y similares.

En algunas realizaciones, los oligómeros de acuerdo con la presente invención pueden contener uno o más grupos con funcionalidad ácido y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” en estos casos se refiere a las sales de adición de base inorgánicas y orgánicas, relativamente no tóxicas, de los compuestos de la presente invención. Estas sales también se pueden preparar in situ en el vehículo de administración o en el proceso de fabricación de la forma farmacéutica, o por la reacción por separado del compuesto purificado en su forma de ácido libre con una base adecuada, como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable, con amoníaco o con una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica farmacéuticamente aceptable. Las sales alcalinas o alcalinotérreas representativas incluyen las sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares. Las aminas orgánicas representantes útiles para la formación de sales de adición de base incluyen etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina y similares. (Véase, por ejemplo, Berge et al., *supra*).

En las composiciones también pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, edulcorantes, agentes saborizantes y de perfume, conservantes y antioxidantes.

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

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosis unitaria y pueden prepararse mediante cualesquiera métodos bien conocidos en la técnica de la ciencia farmacéutica. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria variará dependiendo del hospedador que se va a tratar, y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria generalmente será aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. Generalmente, del cien por cien, esta cantidad variará de aproximadamente 0,1 por ciento a

aproximadamente 99 por ciento de principio activo, preferiblemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferiblemente de aproximadamente 10 por ciento a 30 por ciento.

En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente invención comprende un excipiente seleccionado de ciclodextrinas, celulosas, liposomas, agentes formadores de micelas, por ejemplo, ácidos biliares, y vehículos poliméricos, por ejemplo, poliésteres y polianhídridos; y un oligómero de la presente invención. En ciertas realizaciones, una formulación antes mencionada convierte en biodisponible por vía oral a un oligómero de la presente invención.

Los métodos de preparación de estas composiciones farmacéuticas incluyen la etapa de asociar un oligómero de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más componentes accesorios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan asociando uniforme e íntimamente un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

Las composiciones farmacéuticas de la invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base de sabor, generalmente sacarosa y acacia o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (utilizando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada una una cantidad predeterminada de un oligonucleótido antisentido de la presente invención como un principio activo. Un oligonucleótido antisentido de la presente invención también puede administrarse como un bolo, electuario o pasta.

En las formas farmacéuticas solidas de la invención para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, trocisco y similares), el principio activo se puede mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o cualquiera de lo siguiente: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinil pirrolidona, sacarosa y/o acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario y agentes tensioactivos, tales como poloxámero y lauril sulfato de sodio; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerol, y agentes tensioactivos no iónicos; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio, estearato de zinc, estearato de sodio, ácido esteárico, y sus mezclas; (10) agentes de color; y (11) agentes de liberación controlada tales como crospovidona o etil celulosa. En el caso de las cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden utilizarse como cargas en cápsulas de gelatina blanda y dura utilizando dichos excipientes como lactosa o azúcar de leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Un comprimido puede fabricarse por compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más componentes adicionales. Los comprimidos pueden prepararse usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato almidón de sodio o carboximetilcelulosa de sodio reticulada), agente tensioactivo o de dispersión. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden marcarse o prepararse opcionalmente con revestimientos y cubiertas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de la formulación de productos farmacéuticos. También se pueden formular con el fin de proporcionar una liberación lenta o controlada del principio activo que se está usando, por ejemplo, hidroxipropilmetil celulosa en proporciones variables para proveer el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Pueden formularse para liberación rápida, por ejemplo, en forma liofilizada. Pueden esterilizarse, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o mediante la incorporación de agentes de esterilización en forma de composiciones sólidas estériles que se pueden disolver en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes de su uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberan solo el principio o principios activos, o preferiblemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente de una manera retardada. Ejemplos de composiciones de incorporación que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma micro-encapsulada, si es apropiado, con uno o más de los excipientes antes descritos.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral de los oligonucleótidos antisentido de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes frecuentemente usados en la técnica, tales como por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceite de semilla de algodón, cacahuate, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y sus mezclas.

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

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

Las formulaciones para administración rectal o vaginal se pueden presentar como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más compuestos de la invención, con uno o más excipientes o vehículos no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que es sólido a temperatura ambiente pero líquido a la temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en el recto o cavidad vaginal y liberará el compuesto activo.

Las formulaciones o formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de un oligómero como se proporciona en la presente memoria incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, espumas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. Los oligómeros activos se pueden mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que se necesite. Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc o sus mezclas.

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

Los parches transdérmicos tienen la ventaja adicional de proporcionar una administración controlada de un oligómero de la presente invención al cuerpo. Tales formas farmacéuticas pueden formarse disolviendo o dispensando el oligómero en el medio adecuado. Para incrementar el flujo del agente a través de la piel también se pueden utilizar potenciadores de la absorción. La velocidad de tal flujo puede controlarse proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando al agente en una matriz polimérica o gel, entre otros métodos conocidos en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden comprender uno o más oligómeros de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles farmacéuticamente aceptables o polvos estériles que pueden ser reconstituidos en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener azúcares, alcoholes, antioxidantes, tamponantes, bacteriostáticos, solutos que convierten a la formulación en isotónica con la sangre del receptor destinado o agentes de suspensión o espesantes. Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partícula en el caso de las dispersiones y mediante el uso de agentes tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de los microorganismos sobre los oligómeros en cuestión puede asegurarse por la inclusión de varios agentes a antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en la composición. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

En algunos casos, para prolongar el efecto de un fármaco, es deseable conseguir la absorción lenta del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua, entre otros métodos conocidos en la técnica. La velocidad de absorción del fármaco entonces depende de su velocidad de disolución, que a su vez, puede depender entonces del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, la absorción retardada de una forma farmacéutica administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de los oligómeros en cuestión en polímeros biodegradables tales como poliláctido-poliglicólido. Dependiendo de la relación entre oligómero y polímero y la naturaleza del polímero particular utilizado, se puede controlar la velocidad de liberación del oligómero. Ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se pueden preparar atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

Cuando se administran los oligómeros de la presente invención como productos farmacéuticos, a los seres humanos y animales, estos se pueden administrar per se o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, de 0,1 a 99 % (más preferentemente de 10 a 30 %) del principio activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Como se señaló anteriormente, las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse por vía oral, parenteral, tópica o por vía rectal. Por lo general se dan en formas convenientes para cada vía de administración. Por ejemplo, se administran en comprimidos o en forma de cápsula, por inyección, inhalación, loción oftálmica, pomada, supositorio, etc., administración por inyección, perfusión o inhalación; tópica en loción o pomada; y rectal en supositorios.

Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” como se usa en la presente memoria significa modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección e incluye, sin limitación inyección y perfusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, e intraesternal.

Las frases “administración sistémica,” “administrado sistémicamente”, “administración periférica” y “administrado periféricamente” como se utiliza en la presente memoria significa la administración de un compuesto, fármaco u otro material diferente al que se introduce directamente en el sistema nervioso central, que entra en el sistema del paciente, y así se somete al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, la administración subcutánea.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, el oligonucleótido antisentido de la presente invención, que se puede usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. Los niveles reales de dosificación de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención pueden variar con el fin de obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente.

El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del oligómero particular de la presente invención empleado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción o metabolismo del oligómero particular que se emplea, la tasa y el grado de absorción, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el oligómero particular utilizado, la edad, sexo, peso, condición, salud en general e historial médico previo del paciente que se está tratando y factores similares bien conocidos en la técnica de la medicina.

Un médico o veterinario que tenga experiencia en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la invención usados en la composición farmacéutica a niveles más bajos de los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado e incrementar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de un compuesto de la invención será esa cantidad del compuesto que es la dosis más baja eficaz para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva por lo general dependerá de los factores descritos anteriormente. En general, las dosis por vía oral, intravenosa, intracerebroventricular y subcutáneas de los compuestos de esta invención para un paciente, cuando se utilizan para los efectos indicados, variarán de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal al día.

Si se desea, la dosis diaria efectiva del compuesto activo puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas por separado a intervalos apropiados durante todo el día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias. En ciertas situaciones, la dosificación es una administración al día. En algunas realizaciones, la dosificación es una o más administraciones cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días, o cada

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12 semanas, o cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses, según sea necesario, para mantener la expresión deseada de una proteína distrofina funcional.

Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a las células por una variedad de métodos conocidos para aquellos familiarizados con la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación de otros vehículos, tal como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, tal como se describe en la presente memoria y es conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, puede utilizarse la tecnología de microemulsión para mejorar la biodisponibilidad de agentes farmacéuticos lipófilos (insolubles en agua). Los ejemplos incluyen trimetrina (Dordunoo, S. K., et al., Drug Development and Industrial Pharmacy, 17(12), 1685-1713, 1991 y REV 5901 (Sheen, C. P., et al., J Pharm Sci 80(7), 712-714, 1991). Entre otros beneficios, la microemulsión ofrece una mayor biodisponibilidad por absorción dirigida preferencialmente al sistema linfático en lugar del sistema circulatorio, lo cual evita el hígado, y previene la destrucción de los compuestos en la circulación hepatobiliar.

En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas micelas formadas a partir de un oligómero como se proporciona en la presente memoria y al menos un vehículo anfífilo, en el cual las micelas tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 100 nm. Las realizaciones más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 50 nm, y realizaciones incluso más preferidas proporcionan micelas que tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 30 nm, o incluso menos de aproximadamente 20 nm.

Aunque se contemplan todos los vehículos anfífilos adecuados, los vehículos actualmente preferidos generalmente son aquellos que tienen un estado generalmente reconocido como seguro (GRAS), y que pueden solubilizar el compuesto de la presente invención y microemulsionar en una etapa posterior, cuando la solución entra en contacto con una fase de agua compleja (tal como la que existe en el tracto gastrointestinal humano). Por lo general, los ingredientes anfífilos que satisfacen estos requisitos tienen valores HLB (equilibrio hidrófilo-lipófilo) de 2-20, y sus estructuras contienen a radicales alifáticos de cadena lineal en el intervalo de C-6 a C-20. Los ejemplos son glicéridos grasos glicolizados con polietileno y polietilenglicoles.

Los ejemplos de vehículos anfífilos incluyen glicéridos de ácidos grasos polietilenglicolizados saturados y monoinsaturados, tales como aquellos obtenidos de varios aceites vegetales total o parcialmente hidrogenados. Dichos aceites pueden consistir ventajosamente en tri-, di- y monoglicéridos de ácido graso y di- y monoésteres de polietilenglicol de los ácidos grasos correspondientes, con una composición de ácido graso particularmente preferida que incluye ácido cáprico 4-10, ácido cáprico 3-9, ácido láurico 40-50, ácido mirístico 14-24, ácido palmítico 4-14 y ácido esteárico 5-15 %. Otra clase útil de vehículos anfífilos incluye sorbitán parcialmente esterificado y/o sorbitol, con ácidos grasos saturados o monoinsaturados (serie SPAN) o los análogos etoxilados correspondientes (serie TWEEN).

Los vehículos anfífilos comercializados pueden ser particularmente útiles, incluyendo la serie Gelucire, Labrafil, Labrasol o Lauroglicol (todos fabricados y distribuidos por Gattefosse Corporation, Saint Priest, Francia), PEG-mono-oleato, PEG-di-oleato, PEG-mono-laurato y di-laurato, lecitina, polisorbato 80, etc., (producido y distribuido por un número de empresas en Estados Unidos y en todo el mundo).

En ciertas realizaciones, la administración puede realizarse usando liposomas, nanocápsulas, micropartículas, microesferas, partículas lipídicas, vesículas y similares, para la introducción de las composiciones de la presente invención en las células del hospedador adecuadas. En particular, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden formular para la administración encapsulada en una partícula de lípido, un liposoma, una vesícula, una nanoesfera, una nanopartícula o similares. La formulación y uso de dichos vehículos de administración pueden realizarse mediante técnicas convencionales y conocidas.

Los polímeros hidrófilos adecuados para su uso en la presente invención son aquellos que son fácilmente solubles en agua, pueden unirse covalentemente a lípidos formadores de vesículas, y que son tolerados in vivo sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Los polímeros adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), ácido poliláctico (también denominado poliláctido), ácido poliglicólico (también denominado poliglicólido), un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico y poli(alcohol vinílico). En ciertas realizaciones, los polímeros tienen un peso molecular de aproximadamente 100 o 120 daltons hasta aproximadamente 5.000 o 10.000 daltons, o de aproximadamente 300 daltons a aproximadamente 5.000 daltons. En otras realizaciones, el polímero es polietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 a aproximadamente 5.000 daltons, o que tiene un peso molecular de aproximadamente 300 a aproximadamente 5.000 daltons. En ciertas realizaciones, el polímero es polietilenglicol de 750 daltons (PEG(750)). Los polímeros también pueden ser definidos por el número de monómeros que contienen; una realización preferida de la presente invención utiliza polímeros de al menos aproximadamente tres monómeros, dichos polímeros de PEG consisten en tres monómeros (aproximadamente de 150 daltons).

Otros polímeros hidrófilos que pueden ser adecuados para su uso en la presente invención incluyen polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, y celulosas derivadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

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

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos, que consisten en 6, 7 u 8 unidades de glucosa, designadas por la letra griega α, β, o γ, respectivamente. Las unidades de glucosa están unidas por enlaces α-1, 4-glucosídicos. Como consecuencia de la conformación de silla de las unidades de azúcar, todos los grupos hidroxilo secundarios (en C-2, C-3) se encuentran en un lado del anillo, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios en C-6 se sitúan en el otro lado. Como resultado, las caras externas son hidrófilas, lo que hace que las ciclodextrinas sean solubles en agua. Por el contrario, las cavidades de las ciclodextrinas son hidrófobas, ya que están revestidas por el hidrógeno de los átomos C-3 y C-5, y por oxígenos tipo éter. Estas matrices permiten la formación de complejos con una variedad de compuestos relativamente hidrófobos, que incluyen, por ejemplo, compuestos de esteroides tales como 17α-estradiol (véase, por ejemplo, van Uden et al. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 38:1-3-113 (1994)). La formación de complejos tiene lugar mediante interacciones de Van der Waals y mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Para una revisión general de la química de las ciclodextrinas, véase, Wenz, Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:803-822 (1994).

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

Se han descrito numerosas ciclodextrinas y métodos para su preparación. Por ejemplo, Parmeter (I), et al. (Patente US-3.453.259) y Gramera, et al. (Patente US-3.459.731) describen ciclodextrinas electroneutras. Otros derivados incluyen ciclodextrinas con propiedades catiónicas [Parmeter (II), Patente US-3.453.257], ciclodextrinas reticuladas insolubles (Solms, Patente US-3.420.788) y ciclodextrinas con propiedades aniónicas [Parmeter (III), Patente US-3.426.011]. Entre los derivados de ciclodextrina con propiedades aniónicas, se han añadido a la ciclodextrina original ácidos carboxílicos, ácidos fosforosos, ácidos fosfinosos, ácidos fosfónicos, ácidos fosfóricos, ácidos tiofosfónicos, ácidos tiosulfínicos, y ácidos sulfónicos [véase, Parmeter (III), supra]. Además, se han descrito derivados de sulfoalquil éter ciclodextrina por Stella, et al. (Patente US-5.134.127).

Los liposomas consisten en al menos una membrana bicapa de lípido que incluye un compartimento interno acuoso. Los liposomas pueden caracterizarse por el tipo de membrana y por el tamaño. Las vesículas unilaminares pequeñas (SUV) tienen una sola membrana y por lo general varían entre 0,02 y 0,05 µm de diámetro; las vesículas unilaminares grandes (LUVS) son normalmente mayores de 0,05 µm. Las vesículas grandes oligolaminares y las vesículas multilaminares tienen múltiples capas de membrana, generalmente concéntricas, son normalmente mayores de 0,1 µm. Los liposomas con varias membranas no concéntricas, es decir, varias vesículas más pequeñas contenidas dentro de una vesícula grande, se llaman vesículas multivesiculares.

Un aspecto de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden liposomas que contienen un oligómero de la presente invención, donde la membrana del liposoma está formulada para proporcionar un liposoma con una mayor capacidad de carga. Como alternativa o adicionalmente, el oligonucleótido antisentido de la presente invención puede estar contenido en, o adsorbido sobre, la bicapa liposómica del liposoma. Un oligonucleótido antisentido de la presente invención puede añadirse con un agente tensioactivo de lípido e introducirse dentro del espacio interno de liposoma; en estos casos, la membrana del liposoma está formulada para resistir los efectos que puedan alterar el agregado de agente activo-tensioactivo.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la bicapa lipídica de un liposoma contiene lípidos derivados con polietilenglicol (PEG), de tal manera que las cadenas de PEG se extienden desde la superficie interna de la bicapa lipídica hasta el espacio interior encapsulado por el liposoma, y desde el exterior de la bicapa lipídica hasta el ambiente circundante.

Los agentes activos contenidos dentro de los liposomas de la presente invención están en forma solubilizada. Los agregados del agente tensioactivo y agente activo (tal como emulsiones o micelas que contienen el agente activo de interés) pueden ser atrapados en el espacio interior de los liposomas de acuerdo con la presente invención. Un agente tensioactivo actúa dispersando y solubilizando el agente activo, y puede seleccionarse de cualquier agente tensioactivo alifático, cicloalifático o aromático adecuado, que incluye pero no se limita a lisofosfatidilcolinas (LPG) biocompatibles de diferentes longitudes de cadena (por ejemplo, de aproximadamente C14 a aproximadamente C20). Los lípidos derivados de polímeros tales como los PEG-lípidos también pueden ser utilizados para la formación de micelas ya que actúan inhibiendo la fusión micela/membrana, y dado que la adición de un polímero a las moléculas de agente tensioactivo disminuye la CMC del agente tensioactivo contribuye a la formación de la

micela. Los preferidos son agentes tensioactivos con CMC en el intervalo micromolar; agentes tensioactivos con CMC mayores pueden utilizarse para preparar micelas atrapadas con liposomas de la presente invención.

Los liposomas de acuerdo con la presente invención pueden prepararse por cualquiera de una variedad de técnicas que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente US-4.235.871; Solicitudes PCT publicadas WO 96/14057; New RRC, Liposomes: A practlcal approach, IRL Press, Oxford (1990), páginas 33-104; Lasic DD, Liposomes from physics to applications, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 1993. Por ejemplo, se pueden preparar liposomas de la presente invención mediante la difusión de un lípido derivado con un polímero hidrófilo en liposomas preformados, tal como mediante la exposición de liposomas preformados a micelas compuestas de polímeros injertados con lípido, en las concentraciones de lípido correspondientes al porcentaje final en moles de lípido derivado que se desea en el liposoma. Los liposomas que contienen un polímero hidrófilo pueden estar formados también por homogeneización, hidratación del campo lipídico o técnicas de extrusión, como son conocidos en la técnica.

En otro procedimiento de formulación ilustrativo, el agente activo se dispersa primero por sonicación en una lisofosfatidilcolina u otro agente tensioactivo de CMC bajo (incluyendo lípidos injertados con polímero) que solubiliza fácilmente las moléculas hidrofóbicas. La suspensión micelar resultante del agente activo se utiliza entonces para rehidratar una muestra de lípido seca que contiene un porcentaje en moles adecuado de lípido injertado con polímero, o colesterol. El lípido y la suspensión de agente activo se forma entonces en liposomas que usan técnicas de extrusión como son conocidos en la técnica, y los liposomas resultantes son separados de la solución no encapsulada por separación en columna estándar.

En un aspecto de la presente invención, los liposomas se preparan de modo que tengan tamaños sustancialmente homogéneos en un intervalo de tamaño seleccionado. Un método de dimensionamiento efectivo implica extruir una suspensión acuosa de liposomas a través de una serie de membranas de policarbonato que tienen un tamaño de poro uniforme seleccionado; el tamaño de poro de la membrana se corresponderá aproximadamente con los tamaños más grandes de liposomas producidos mediante extrusión a través de esa membrana. Véase por ejemplo, Patente US-4.737.323 (12 de abril de 1988). En ciertas realizaciones, se pueden utilizar reactivos, tales como DharmaFECT® y Lipofectamine® para introducir polinucleótidos o proteínas en las células.

Las características de liberación de una composición farmacéutica de la presente invención dependen del material de encapsulamiento, la concentración del fármaco encapsulado, y la presencia de modificadores de la liberación. Por ejemplo, la liberación puede ser manipulada para ser dependiente de pH, por ejemplo, usando un recubrimiento sensible al pH que libera solo en un pH bajo, como en el estómago, o un pH más alto, como en el intestino. Un recubrimiento entérico puede utilizarse para prevenir que la liberación ocurra hasta después del paso a través del estómago. Pueden utilizarse múltiples recubrimientos o mezclas de cianamida encapsuladas en diferentes materiales para obtener una liberación inicial en el estómago, seguido por una liberación posterior en el intestino. La liberación también puede ser manipulada por la inclusión de sales o agentes de formación de poro, que pueden aumentar la absorción de agua o liberación de fármaco por difusión desde la cápsula. También pueden utilizarse los excipientes que modifican la solubilidad del fármaco para controlar la tasa de liberación. Los agentes que intensifican la degradación de la matriz o la liberación desde la matriz también se pueden incorporar. Pueden añadirse al fármaco, añadirse como una fase separada (es decir, en forma de partículas), o pueden ser co-disueltos en la fase de polímero dependiendo del compuesto. En la mayoría de los casos la cantidad debe ser entre 0,1 y treinta por ciento (p/p de polímero). Los tipos de intensificadores de la degradación incluyen sales inorgánicas tales como sulfato de amonio y cloruro de amonio, ácidos orgánicos tal como ácido cítrico, ácido benzoico y ácido ascórbico, bases inorgánicas tales como carbonato de sodio, carbonato de potasio, carbonato de calcio, carbonato de zinc, e hidróxido de zinc, y bases orgánicas tales como sulfato de protamina, espermina, colina, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina y agentes tensioactivos tales como Tween® y Pluronic®. Los agentes de formación de poros que añaden microestructura a las matrices (es decir, compuestos solubles en agua tales como sales inorgánicas y azúcares) se agregan en forma de partículas. El intervalo es generalmente entre uno y treinta por ciento (p/p de polímero).

La absorción también puede ser manipulada alterando el tiempo de residencia de las partículas en el intestino. Esto puede lograrse, por ejemplo, recubriendo la partícula con, o seleccionando como el material de encapsulamiento, un polímero adhesivo mucosal. Los ejemplos incluyen la mayoría de polímeros con grupos carboxilo libres, tal como quitosano, celulosas y especialmente poliacrilatos (como se usa en la presente memoria, poliacrilatos se refiere a polímeros que incluyen grupos acrilato y grupos acrilato modificados tales como cianoacrilatos y metacrilatos).

Un oligómero puede ser formulado para estar contenido dentro, o, adaptado para liberarse mediante un dispositivo quirúrgico o médico o implante. En ciertos aspectos, un implante puede ser recubierto o bien tratado con un oligómero. Por ejemplo, pueden utilizarse hidrogeles u otros polímeros, tales como polímeros biocompatibles y/o biodegradables, para recubrir un implante con las composiciones de la presente invención (es decir, la composición puede adaptarse para su uso con un dispositivo médico usando un hidrogel u otro polímero). Los polímeros y co-polímeros para dispositivos médicos de recubrimiento con un agente son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de implantes incluyen, pero no se limitan a, stents, stents de elución de fármaco, suturas, prótesis, catéteres vasculares, catéter de diálisis, injertos vasculares, válvulas cardíacas protésicas, marcapasos cardiacos,

desfibriladores cardioversores implantables, agujas IV, dispositivos de ajuste y formación ósea, tales como pernos, tornillos, placas y otros dispositivos, y matrices de tejido artificial para la cicatrización de heridas.

Además de los métodos proporcionados en la presente memoria, los oligómeros para su uso de acuerdo con la invención pueden formularse para la administración de cualquier manera conveniente para su uso en medicina humana o veterinaria, por analogía con otros productos farmacéuticos. Los oligómeros antisentido y sus formulaciones correspondientes pueden administrarse solos o en combinación con otras estrategias terapéuticas en el tratamiento de la distrofia muscular, tal como trasplante de mioblasto, terapias con células madre, administración de antibióticos aminoglucósidos, inhibidores de proteasoma y terapias de regulación al alza (por ejemplo, regulación al alza de utrofina, un parálogo autosómico de distrofina).

Las vías de administración descritas solo tienen como objetivo servir de guía puesto que un profesional con experiencia será capaz de determinar fácilmente la vía óptima de administración y cualquier dosificación para cualquier animal y afección en particular. Se han probado múltiples enfoques para introducir material genético nuevo funcional en las células, tanto in vitro como in vivo (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1280). Estos enfoques incluyen la integración del gen a expresarse en retrovirus modificados (Friedmann (1989) supra; Rosenberg (1991) Cancer Research 51(18), suppl.: 5074S-5079S); integración en vectores no retrovirus (por ejemplo, vectores virales adeno-asociados) (Rosenfeld, et al. (1992) Cell, 68:143-155; Rosenfeld, et al. (1991) Science, 252:431-434); o la administración de un transgen ligado a un elemento potenciador de promotor heterólogo mediante liposomas (Friedmann (1989), supra; Brigham, et al. (1989) Am. J. Med. Sci., 298:278- 281; Nabel, et al. (1990) Science, 249:1285-1288; Hazinski, et al. (1991) Am. J. Resp. Cell Molec. Biol., 4:206-209; y Wang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 84:7851-7855); acoplado a sistemas de transporte basados en catión, específicos de ligando (Wu and Wu (1988) J. Biol. Chem., 263:14621-14624) o el uso de vectores de expresión de ADN desnudo (Nabel et al. (1990), supra); Wolff et al. (1990) Science, 247:1465-1468). La inyección directa de los transgenes en tejido produce solo expresión localizada (Rosenfeld (1992) supra); Rosenfeld et al. (1991) supra; Brigham et al. (1989) supra; Nabel (1990) supra; y Hazinski et al. (1991) supra). The Brigham et al. group (Am. J. Med. Sci. (1989) 298:278-281 and Clinical Research (1991) 39 (resumen)) han descrito la transfección in vivo solo de pulmones de los ratones tras la administración intravenosa o intratraqueal de un complejo de liposomas-ADN. Un ejemplo de un artículo de revisión de procedimientos de terapia génica es: Anderson, Science (1992) 256:808-813.

IV. Ejemplos

Materiales y Métodos

Condiciones de tratamiento de células y cultivo tisular

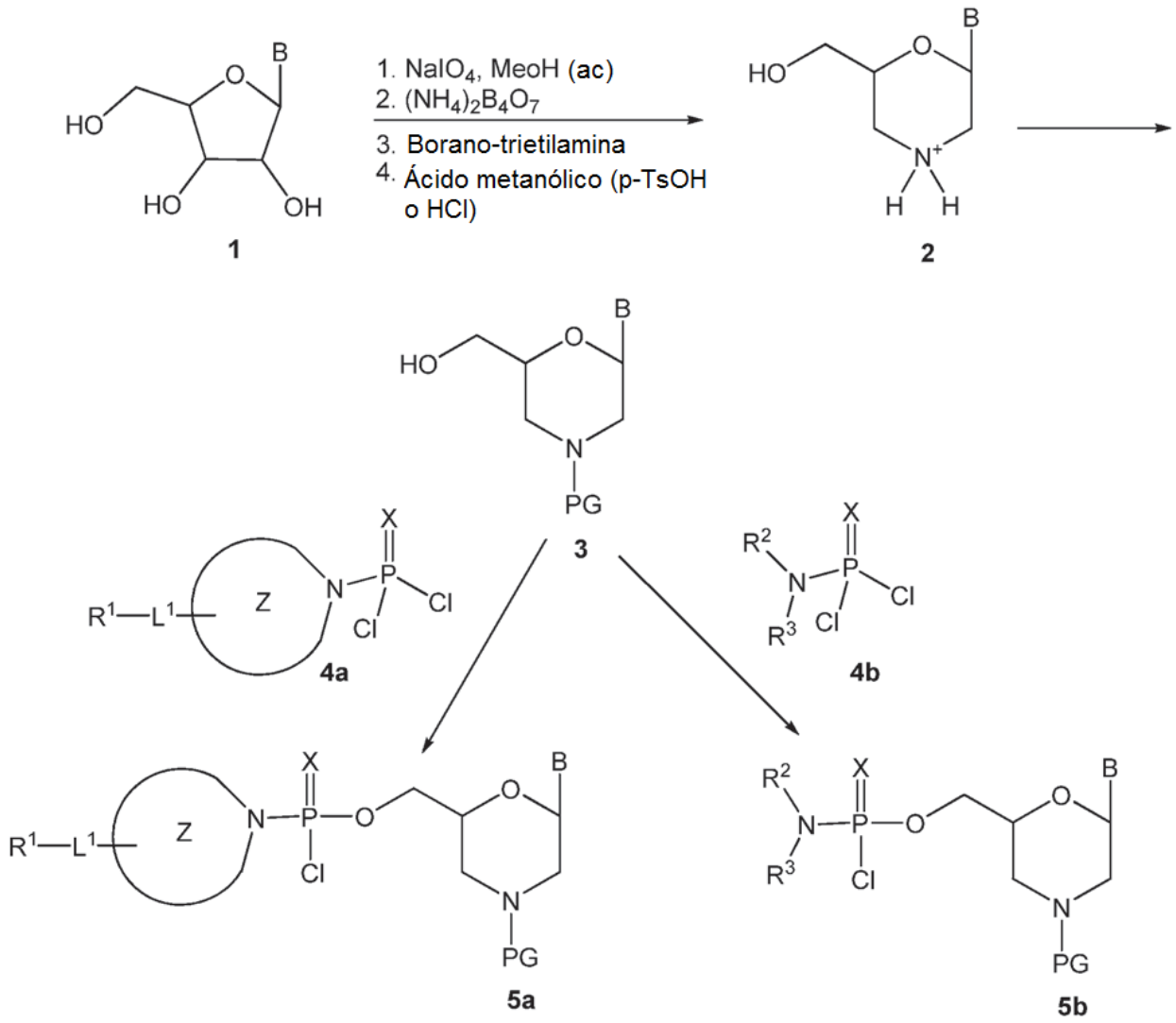
Se sembraron células de rabdomiosarcoma humanas (ATCC, CCL-136; células RD) en matraces T75 tratados con cultivo de tejidos (Nunc) a 1,5 x 10^6 células/matraz en 24 ml de DMEM calentado con L-glutamina (HyClone), suero bovino fetal 10 % y solución antibiótica de penicilina-estreptomicina 1 % (CelGro); después de 24 horas, los medios se aspiraron, las células se lavaron una vez en PBS calentado y se agregó medio fresco. Las células se cultivaron hasta el 80 % de confluencia en una incubadora a 37°C en 5,0 % de CO_2 y se cosecharon usando tripsina. Los oligómeros de morfolino fosforodiamidato liofilizados (PMO) se suspendieron de nuevo en aproximadamente 0,5 a 2,0 mM en agua libre de nucleasa; para verificar la molaridad, se midieron soluciones de PMO usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Los PMO se administraron a las células RD con nucleoporación según las instrucciones del fabricante y el kit SG (Lonza). Los PMO fueron probados en diferentes concentraciones, como se indica (por ejemplo, 2,5, 5, 10, 12,5, 20 y 25 micromolar). Las células fueron incubadas durante 24 horas después de la nucleoporación a aproximadamente 2-3 x 10^5 células por pocillo de una placa de 12 o 24 pocillos (n = 2 o 3) y después se sometieron a la extracción de ARN como se describe a continuación.

Los mioblastos humanos primarios fueron cultivados en medio de crecimiento de células del músculo esquelético (PromoCell) utilizando técnicas estándar. La nucleoporación de los PMO a diferentes concentraciones se realizó como se describe para las células RD anteriores. Las células se sembraron por triplicado en pocillos de una placa de 12 pocillos en medio de crecimiento PromoCell y se dejó incubar durante 24 horas antes de la extracción de ARN como se describe a continuación.

Extracción de ARN y amplificación por PCR

Se extrajo ARN de células tratadas con PMO (células RD o mioblastos humanos primarios) usando el kit de aislamiento de ARN de 96 pocillos RNAspin de GE Healthcare y sometido a RT-PCR anidada usando técnicas estándar y los siguientes pares de cebadores. Cebadores externos: directo 5'-CTTGGACAGAACTTACCGACTGG-3' (SEQ ID NO: 22), inverso 5'-GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG-3'(SEQ ID NO: 23); cebadores internos: directo 5'-GCAGGATTTGGAACAGAGGCG-3'(SEQ ID NO: 25), inverso 5'-CATCTACATTTGTCTGCCACTGG-3'(SEQ ID NO: 25). El salto del exón se midió por electroforesis en gel o mediante el bioanalizador Caliper LabChip y se representó gráficamente el porcentaje de salto del exón (es decir, intensidad de la banda del producto en el que se saltó el exón respecto al producto de PCR de longitud completa) como se muestra en las Figuras 3-5.

Preparación de subunidades de morfolino, PMO y PMO con enlaces inter-subunidad modificados



Esquema 1: Ruta sintética general del PMO y subunidades de PMO modificadas

En referencia al Esquema de reacción 1, en el que B representa un radical de apareamiento de bases y PG representa un grupo protector, las subunidades de morfolino se pueden preparar a partir del ribonucleósido correspondiente (1) como se muestra. La subunidad de morfolino (2) puede ser opcionalmente protegida por reacción con un precursor de grupo protector adecuado, por ejemplo cloruro de tritilo. El grupo protector 3' generalmente se elimina durante la síntesis del oligómero en estado sólido como se describe en más detalle a continuación. El radical de apareamientos de bases puede estar convenientemente protegido para la síntesis del oligómero en fase sólida. Los grupos protectores adecuados incluyen benzoílo para adenina y citosina, fenilacetilo para guanina y pivaloiloximetilo para hipoxantina (I). El grupo pivaloiloxlmetilo se puede introducir en la posición N1 de la base heterocíclica de hipoxantina. Aunque se puede emplear una subunidad desprotegida de hipoxantina, los rendimientos de las reacciones de activación son muy superiores cuando la base está protegida. Otros grupos protectores adecuados incluyen los divulgados en la Patente US-8.076.476, que se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

La reacción de 3 con el compuesto de fósforo activado 4a o 4b da como resultado subunidades morfolino con el radical de enlace deseado (5a o 5b). Hay que señalar que los radicales R^1 y/o L^1 también se pueden instalar en el anillo heterocíclico Z después de la formación del enlace P-O o incluso después que la subunidad se haya incorporado en un oligómero.

Los compuestos de estructura 4a o 4b se pueden preparar usando cualquier número de métodos conocidos por aquellos expertos en la materia, incluyendo aquellos descritos en los ejemplos. El acoplamiento con el radical morfolino procede a continuación como se ha señalado más arriba.

Los compuestos de estructura 5a o 5b se pueden usar en la síntesis del oligómero en fase sólida para la preparación de oligómeros que comprenden los enlaces inter-subunidad. Tales métodos son bien conocidos en la técnica. Brevemente, un compuesto de estructura 5a o 5b se puede modificar en el extremo 5' para contener un conector unido a un soporte sólido. Una vez soportado, se elimina el grupo protector de 5a o 5b (por ejemplo, tritilo en el extremo 3') y la amina libre reacciona con un radical fosforoso activado de un segundo compuesto de estructura 5 (o un análogo del mismo). Esta secuencia se repite hasta obtener la longitud oligo deseada. El grupo protector en el extremo 3' terminal puede eliminarse o dejarse si se desea una modificación 3'. El oligo se puede retirar del soporte sólido usando cualquier método, o tratamiento de ejemplo con una base para escindir el enlace con el soporte sólido.

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

Ejemplo 1

Preparación de oligómeros de morfolino

La preparación de los compuestos de la invención se realiza utilizando el siguiente protocolo:

Preparación de carbamato de tritil fenil piperazina 35 (Figura 2): A una suspensión enfriada del compuesto 11 en diclorometano (6 ml/g 11) se añadió una solución de carbonato de potasio (3,2 eq) en agua (4 ml/g de carbonato de potasio). A esta mezcla de dos fases se añadió lentamente una solución de cloroformiato de fenilo (1,03 eq) en diclorometano (2 g/g de cloroformiato de fenilo). La mezcla de reacción se calentó a 20 °C. Una vez finalizada la reacción (1-2 horas), se separaron las capas. La capa orgánica se lavó con agua y se secó sobre carbonato de potasio anhidro. El producto 35 se aisló por cristalización en acetonitrilo.
Preparación de alcohol de carbamato 36: Se suspendió hidruro de sodio (1,2 eq) en 1-metil-2-pirrolidinona (32 ml/g de hidruro de sodio). A esta suspensión se agregaron trietilenglicol (10,0 eq) y el compuesto 35 (1,0 eq). La suspensión resultante se calentó a 95 °C. Una vez finalizada la reacción (1-2 horas), se enfrió la mezcla a 20 °C. A esta mezcla se agregó diclorometano/metil terc-butil éter 30 % (v:v) y agua. La capa orgánica que contiene el producto se lavó sucesivamente con NaOH acuoso, ácido succínico acuoso y cloruro de sodio acuoso saturado. El producto 36 se aisló por cristalización en diclorometano/metil terc-butil éter/heptano.
Preparación de ácido de la cola 37: A una solución del compuesto 36 en tetrahidrofurano (7 ml/g 36) se añadió anhídrido succínico (2,0 eq) y DMAP (0,5 eq). La mezcla se calentó a 50 °C. Una vez finalizada la reacción (5 horas), la mezcla se enfrió a 20 °C y se ajustó a pH 8,5 con $NaHCO_3$ acuoso. Se añadió metil terc-butil éter y el producto fue extraído en la capa acuosa. Se añadió diclorometano, y la mezcla se ajustó a pH 3 con ácido cítrico acuoso. La capa orgánica que contiene el producto se lavó con una mezcla de tampón citrato pH = 3 y cloruro de sodio acuoso saturado. Esta solución de diclorometano de 37 fue utilizada sin aislamiento en la preparación del compuesto 38.
Preparación de 38: A la solución del compuesto 37 se añadió imida del ácido N-hidroxi-5-norbornen-2,3-dicarboxílico (HONB) (1,02 eq), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (0,34 eq) y después clorhidrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) (1,1 eq). La mezcla se calentó a 55 °C. Una vez finalizada la reacción (4-5 horas), la mezcla se enfrió a 20 °C y se lavó sucesivamente con ácido cítrico 0,2 M/salmuera 1:1 y salmuera. Se cambió el disolvente de la solución de diclorometano a acetona y después a N,N-dimetilformamida y el producto se aisló por precipitación en acetona/N,N-dimetilformamida en cloruro de sodio acuoso saturado. El producto crudo se resuspendió varias veces en agua para eliminar los restos de N,N-dimetilformamida y las sales.

La introducción de la “cola” activada en la resina cargada con ancla se realizó en dimetil imidazolidinona (DMI) mediante el procedimiento utilizado para la incorporación de las subunidades durante la síntesis en fase sólida.

Preparación del soporte sólido para la síntesis de oligómeros de morfolino: Este procedimiento se realizó en un recipiente de péptido con camisa, silanizado (ChemGlass, NJ, USA) con una frita de vidrio de porosidad gruesa (40-60 µm), agitador superior y llave de teflón de 3 vías para permitir que el N2 burbujee a través de la frita o tras extracción con vacío.

Las etapas de tratamiento/lavado de la resina en el procedimiento siguiente consiste en dos operaciones básicas: fluidización de la resina o reactor de lecho agitado y extracción en disolvente/solución. Para la fluidización de la resina, se colocó la llave de paso para permitir el flujo ascendente de N2 a través de la frita y se añadió al reactor el tratamiento/lavado de la resina especificado y se dejó impregnar y mojar completamente la resina. Se inició entonces la mezcla y la suspensión de la resina se mezcló durante el tiempo especificado. Para la extracción en disolvente/solución, se detuvo la mezcla y el flujo de N2 y se inició la bomba de vacío y a continuación se colocó la

llave de paso para permitir la evacuación del tratamiento/lavado de resina para su eliminación. Todos los volúmenes de tratamiento/lavado de resina fueron de 15 ml/g de resina a menos que se indique lo contrario.
A una resina de aminometilpoliestireno (malla 100-200, carga de ~1,0 mmol/g basado en la sustitución de nitrógeno; 75 g, 1 eq, Polymer Labs, Reino Unido, parte N.º 1464-X799) en un recipiente de péptido con camisa, silanizado se añadió 1-metil-2-pirrolidinona (NMP; 20 ml/g resina) y la resina se dejó hinchar con el mezclado durante 1-2 horas. Tras la evacuación del disolvente hinchado, la resina se lavó con diclorometano (2 x 1-2 min), diisopropiletilamina 5 % en isopropanol/diclorometano 25 % (2 x 3-4 min) y diclorometano (2 x 1-2 min). Después de la evacuación del lavado final, la resina fue tratada con una solución de anclaje disulfuro 34 en 1-metil-2- pirrolidinona (0,17 M; 15 ml/g de resina, ~2,5 eq) y la mezcla de resina/reactivo fue calentada a 45 °C durante 60 horas. Al finalizar la reacción, se interrumpió el calentamiento y la solución de anclaje fue evacuada y la resina se lavó con 1-metil-2-pirrolidinona (4 x 3-4 min) y diclorometano (6 x 1-2 min). La resina fue tratada con una solución de 10 % (v/v) de dicarbonato de dietilo en diclorometano (16 ml/g; 2 x 5-6 minutos) y luego se lavó con diclorometano (6 x 1-2 min). La resina 39 (véase la Figura 3) se secó en una corriente de N2 durante 1-3 horas y después a vacío hasta un peso constante (± 2 %). Rendimiento: 110-150 % del peso original de la resina.

Determinación de la carga de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro: La carga de la resina (número de sitios reactivos potencialmente disponibles) se determina mediante un análisis espectrométrico para el número de grupos trifenilmetilo (tritil) por gramo de resina.

Un peso conocido de resina seca (25 ± 3 mg) se transfiere a un matraz aforado silanizado de 25 ml y se agrega ~5 ml de 2 % (v/v) de ácido trifluoroacético en diclorometano. Los contenidos se mezclan agitando suavemente y luego se dejan reposar durante 30 minutos. El volumen se lleva hasta 25 ml con ácido trifluoroacético adicional 2 % (v/v) en diclorometano y el contenido se mezcla a fondo. Usando una pipeta de desplazamiento positivo, se transfiere una alícuota de la solución que contiene tritilo (500 µl) a un matraz aforado de 10 ml y se completa el volumen hasta 10 ml con ácido metanosulfónico.

El contenido de catión tritilo en la solución final se mide por absorbancia UV a 431,7 nm y la carga de resina se calculó en grupos tritilo por gramo de resina (pmol/g) usando los volúmenes, diluciones, coeficiente de extinción (ε: 41 $\mu mol^{-1}\ cm^{-1}$) y peso de la resina adecuados. El ensayo se realizó por triplicado y se calculó una carga promedio.

El procedimiento de carga de la resina en este ejemplo proporcionará la resina con una carga de aproximadamente 500 µmol/g. Una carga de 300-400 µmol/g se obtiene si se realiza la etapa de incorporación del anclaje de disulfuro durante 24 horas a temperatura ambiente.

Carga de la cola: Utilizando la misma configuración y volúmenes en cuanto a la preparación de la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro, se puede introducir la cola en un soporte sólido. La resina de anclaje cargada fue desprotegida primero en condiciones ácidas y el material resultante se neutralizó antes del acoplamiento. Para la etapa de acoplamiento, se usó una solución de 38 (0.2 M) en DMI que contiene 4-etilmorfolina (NEM, 0,4 M) en lugar de la solución de anclaje de disulfuro. Después de 2 horas a 45 °C, la resina 39 se lavó dos veces con diisopropiletilamina 5 % en isopropanol/diclorometano 25 % y una vez con DCM. A la resina se añadió una solución de anhídrido benzoico (0,4 M) y NEM (0,4 M). Después de 25 minutos, la camisa del reactor se enfrió a temperatura ambiente, y la resina se lavó dos veces con diisopropiletilamina 5 % en isopropanol/diclorometano 25 % y ocho veces con DCM. La resina 40 se filtró y se secó a alto vacío. La carga de la resina 40 se define como la carga de la resina aminometilpoliestireno-disulfuro 39 original usada en la carga de la cola.

Síntesis en fase sólida: Los oligómeros de morfolino se prepararon en un sintetizador automatizado de péptidos AMS-422 de Gilson en columnas de reacción de propileno Gilson de 2 ml (parte N.º 3980270). Se colocó un bloque de aluminio con canales para el flujo de agua alrededor de las columnas conforme se saturan en el sintetizador. El AMS-422 añadirá alternativamente soluciones de reactivo/lavado, se mantuvo durante un tiempo especificado y evacuará las columnas usando vacío.

Para los oligómeros en el intervalo de hasta aproximadamente 25 subunidades de longitud, se prefiere la resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con la carga cerca de 500 µmol/g de resina. Para los oligómeros más grandes, se prefiere una resina de aminometilpoliestireno-disulfuro con una carga de 300-400 µmol/g de resina. Si se desea una molécula con cola en 5', se elige la resina que se ha cargado con la cola siguiendo las mismas directrices de carga.

Se prepararon las siguientes soluciones de reactivo:
Solución de destritilación: ácido cianoacético 10 % (p/v) en diclorometano/acetonitrilo 4:1; Solución de neutralización: diisopropiletilamina 5 % en diclorometano/isopropanol 3:1; solución de acoplamiento: subunidad de morfolino activada 0,18 M (o 0,24 M para los oligómeros que han crecido hasta más de 20 subunidades) de la base y tipo de enlace deseados y N-etilmorfolina 0,4 M, en 1,3-dimetilimidazolidinona. Se usó diclorometano (DCM) como un lavado de transición separando los diferentes lavados de solución de reactivo.

En el sintetizador, con el bloque fijado a 42 °C, se añadió a cada columna que contiene 30 mg de resina de aminometilpoliestireno-disulfuro (o resina de cola) 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona y se dejó asentar a temperatura

ambiente durante 30 minutos. Después de lavar 2 veces con 2 ml de diclorometano, se empleó el siguiente ciclo de síntesis:

Etapa	Volumen	Dispensación	Tiempo de retención
Detritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Detritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Detritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Detritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Detritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Detritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
Detritilación	1,5 ml	Colector	15 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Acoplamiento	350-500 µl	Jeringa	40 minutos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
Neutralización	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos
DCM	1,5 ml	Colector	30 segundos

Las secuencias de los oligómeros individuales se programaron en el sintetizador para que cada columna reciba la solución de acoplamiento apropiada (A, C, G, T, I) en la secuencia apropiada. Cuando el oligómero de una columna había completado la incorporación de su subunidad final, la columna se eliminaba del bloque y se realizaba manualmente un ciclo final con una solución de acoplamiento que comprendía cloruro de 4-metoxitrifenilmetilo (0,32 M en DMI) que contiene 4-etilmorfolina 0,89 M.

Escisión de la resina y la eliminación de bases y grupos protectores de la cadena principal: Después de la metoxitritilación, la resina se lavó 8 veces con 2 ml de 1-metil-2-pirrolidinona. Se añadió un ml de una solución de escisión que consiste en 1,4-ditiotreitol (DTT) 0,1 M y trietilamina 0,73 M en 1-metil-2-pirrolidinona, la columna se tapó, y se dejó asentar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de este tiempo, la solución se drenó en un vial de Wheaton de 12 ml. La resina visiblemente encogida, se lavó dos veces con 300 µl de solución de escisión. A la solución se añadió 4,0 ml de amoníaco acuoso concentrado (almacenado a -20°C), el vial se tapó herméticamente (con tapa de rosca alineada de Teflón), y la mezcla se sometió a movimientos circulares para mezclar la solución. El vial se colocó en un horno a 45 °C durante 16-24 horas para efectuar la escisión de la base y los grupos protectores de la cadena principal.

Purificación del producto crudo: La solución de amonolisis en vial se eliminó del horno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La solución se diluyó con 20 ml de amoníaco acuoso al 0,28 % y se pasó a través de una columna de 2,5 x 10 cm que contiene resina Macroprep HQ 35 (BioRad). Se usó un gradiente de sal (A: 0,28 % de amoníaco con B: cloruro de sodio 1M en 0,28 % de amoníaco; 0-100 % de B en 60 min) para eluir el pico que contiene metoxitritilo. Las fracciones combinadas se agruparon y procesaron dependiendo del producto deseado.

Desmetoxitritilación de oligómeros de morfolino: Las fracciones agrupadas de la purificación de Macroprep se trataron con H_3PO_4 1M para disminuir el pH a 2,5. Después de la mezcla inicial, las muestras se asentaron a temperatura ambiente durante 4 minutos, tras lo cual se neutralizan a pH 10-11 con amoníaco 2,8 %/agua. Los productos se purificaron por extracción en fase sólida (SPE).

Empaquetamiento y acondicionamiento de la columna SPE: Amberchrome CG-300M (Rohm and Haas; Philadelphia, PA) (3 ml) se empaqueta en columnas fritadas de 20 ml (columnas de cromatografía BioRad Econo-Pac (732-1011))

y la resina se enjuaga con 3 ml de lo siguiente: 0,28 % de NH_4OH/80 % de acetonitrilo; NaOH 0,5M/20 % de etanol; agua; 50 mM H_3PO_4/80 % de acetonitrilo; agua; NaOH 0,5 M/20 % de etanol; agua; 0,28 % de NH_4OH.

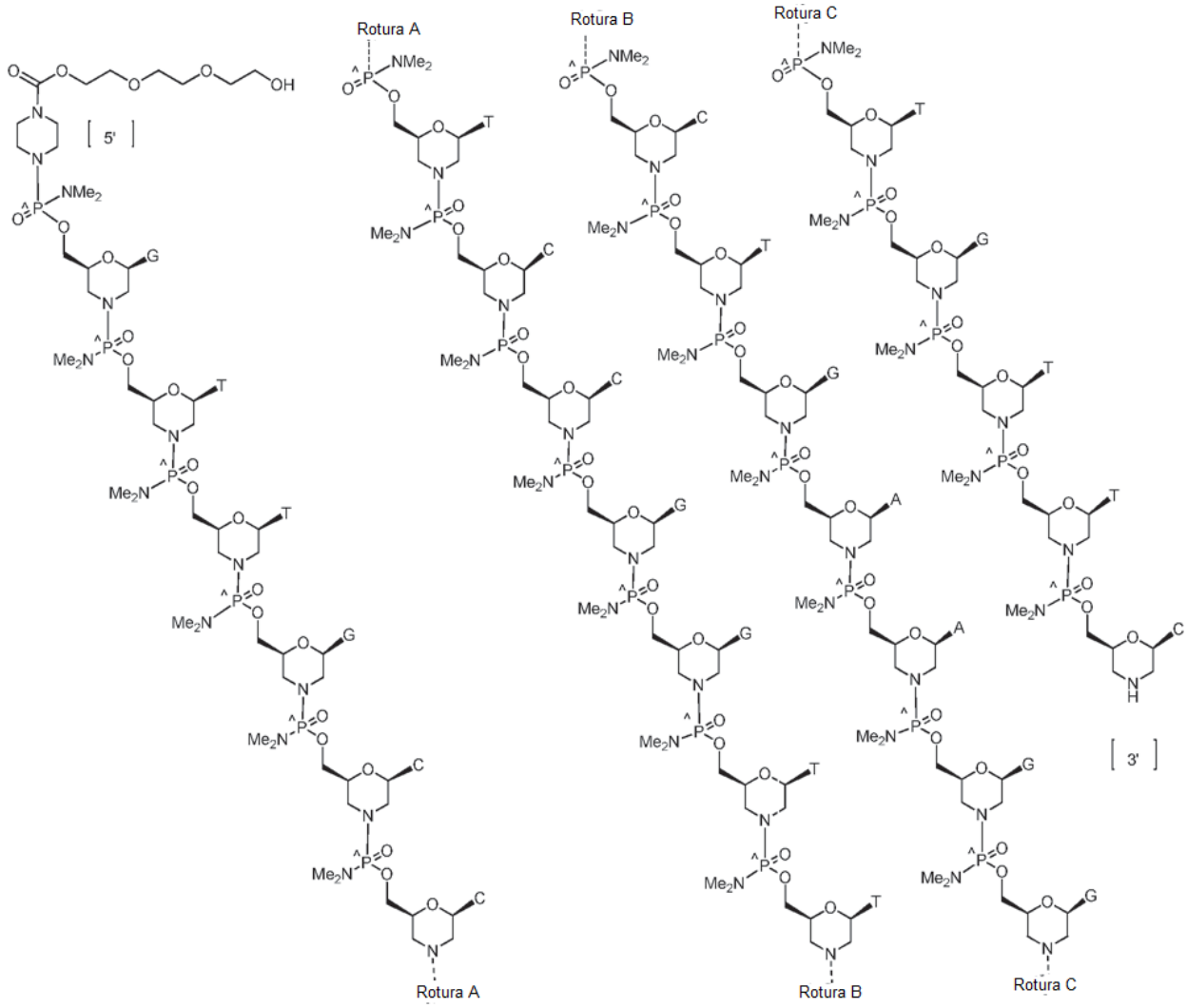
Purificación de SPE: La solución de desmetoxitritilación se cargó en la columna y la resina se lavó tres veces con 3-6 ml de amoníaco acuoso 0,28 %. Se colocó un vial de Wheaton (12 ml) bajo la columna y el producto se eluyó con dos lavados con 2 ml de acetonitrilo 45 % en amoníaco acuoso 0,28 %

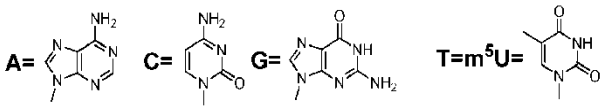
Aislamiento del producto: Las soluciones se congelaron en hielo seco y los viales se colocaron en un liofilizador para producir un polvo blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en agua, se filtraron a través de un filtro de 0,22 micrómetros (Pall Life Sciences, filtro de jeringa Acrodisc de 25 mm, con una membrana HT Tuffryn de 0,2 micrómetros) utilizando una jeringa y la densidad óptica (OD) se midió en un espectrofotómetro UV para determinar las unidades de OD del oligómero presente, así como dispensar una muestra para análisis. Las soluciones se colocaron de nuevo en viales de Wheaton para liofilización.

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

Ejemplo 2

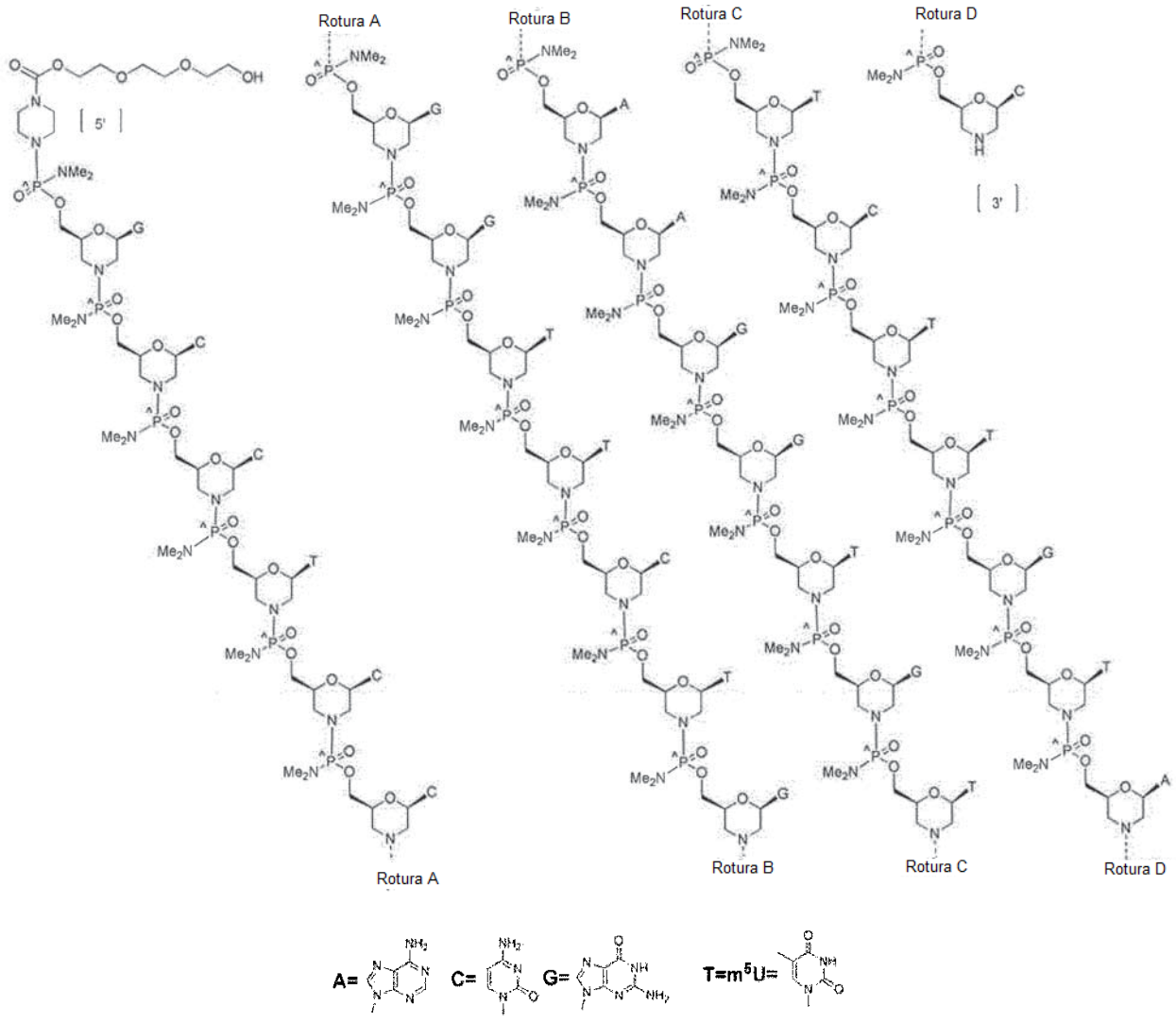
Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, se sintetizó el siguiente PMO, H53A(+36+60), SEQ ID NO: 1 (5'-GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3') y se usó en los ejemplos.





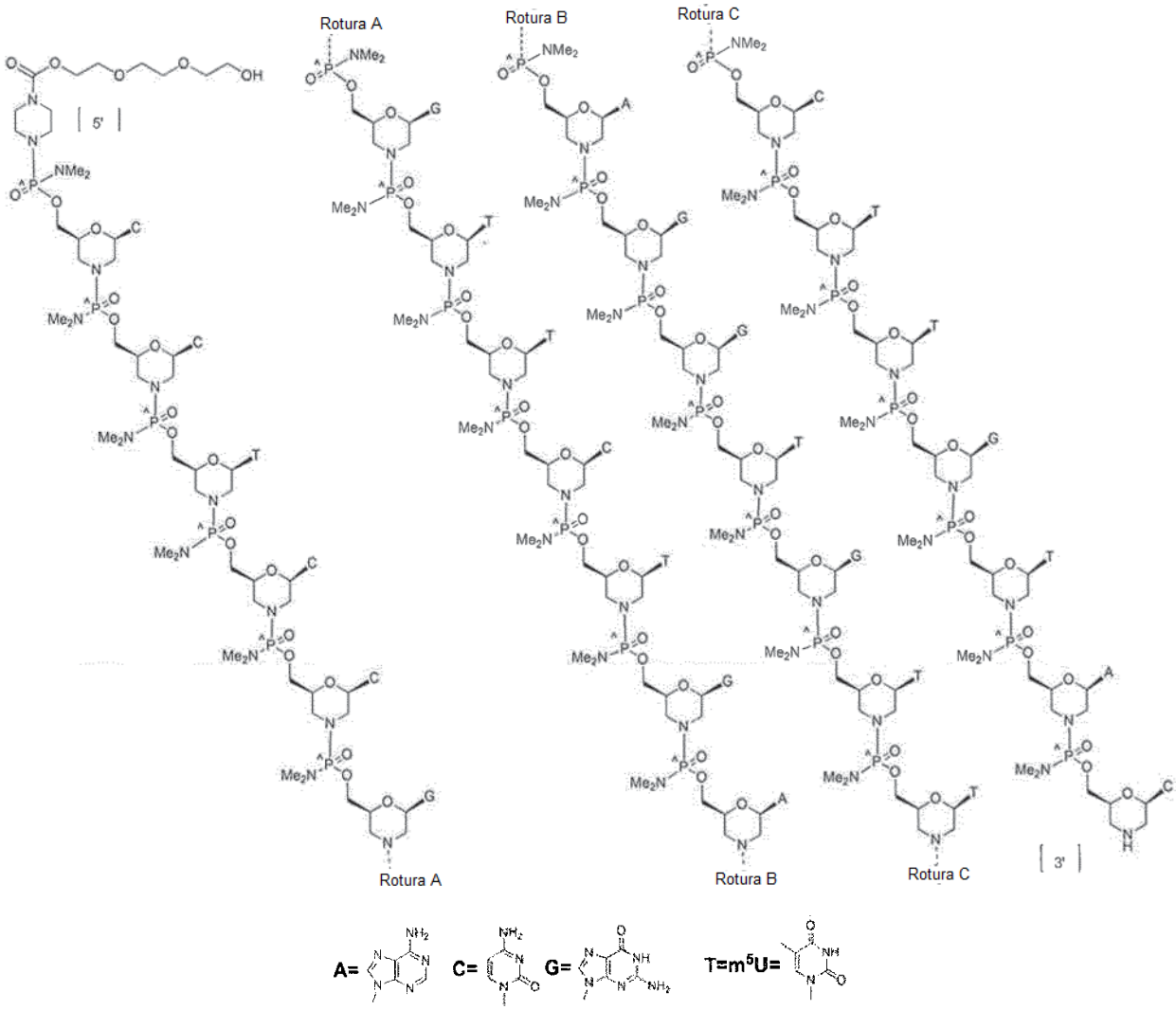
Ejemplo de referencia 3

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, se sintetizó el siguiente PMO, H53A(+30+57), SEQ ID NO: 2 (5'-GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT GTA C-3') y se usó en los Ejemplos.



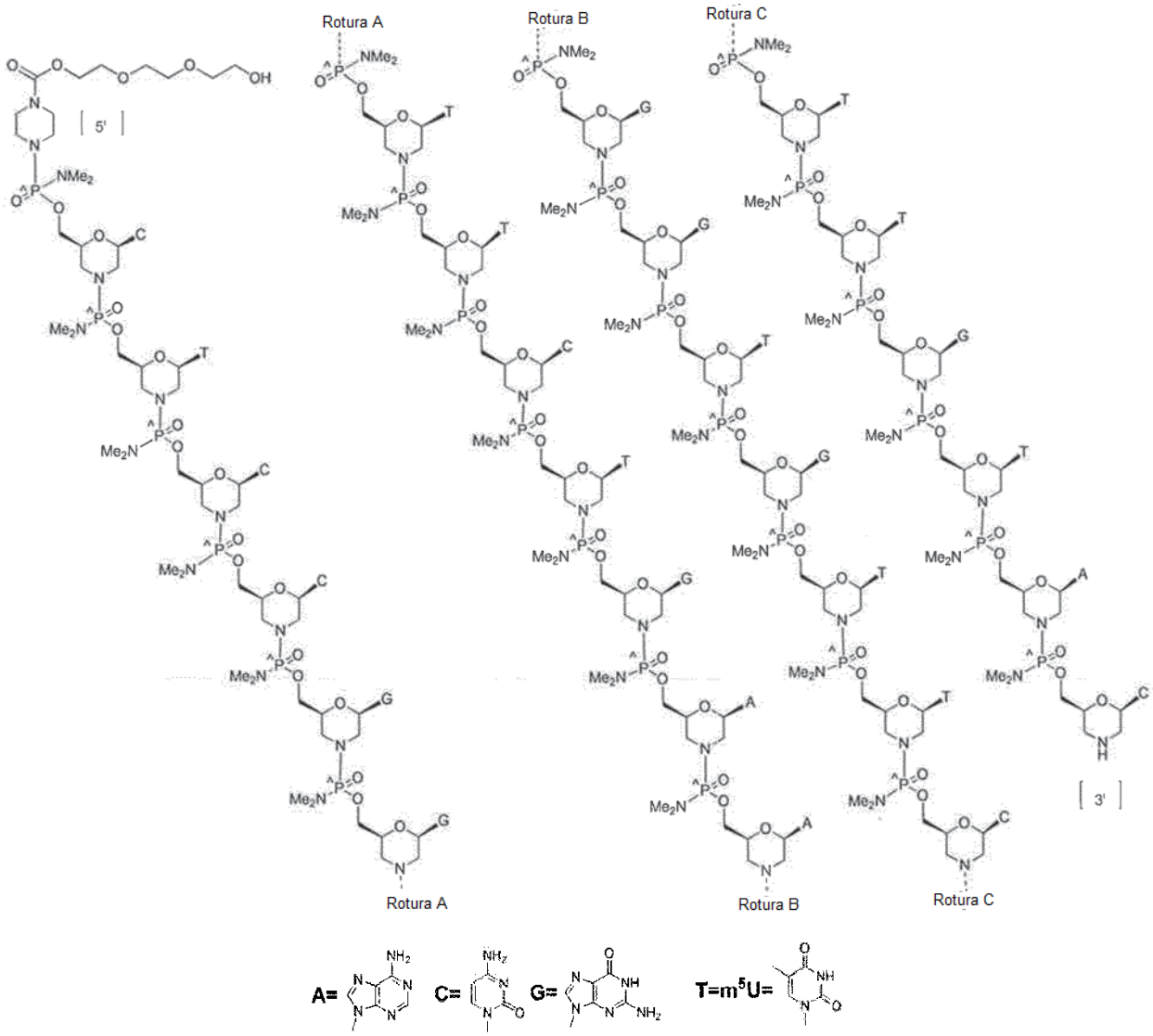
Ejemplo de referencia 4

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, se sintetizó el siguiente PMO, H53A(+30+56), SEQ ID NO: 3 (5'-CCT CCG GTT CTG AAG GTG TTC TTG TAC-3') y se usó en los Ejemplos.



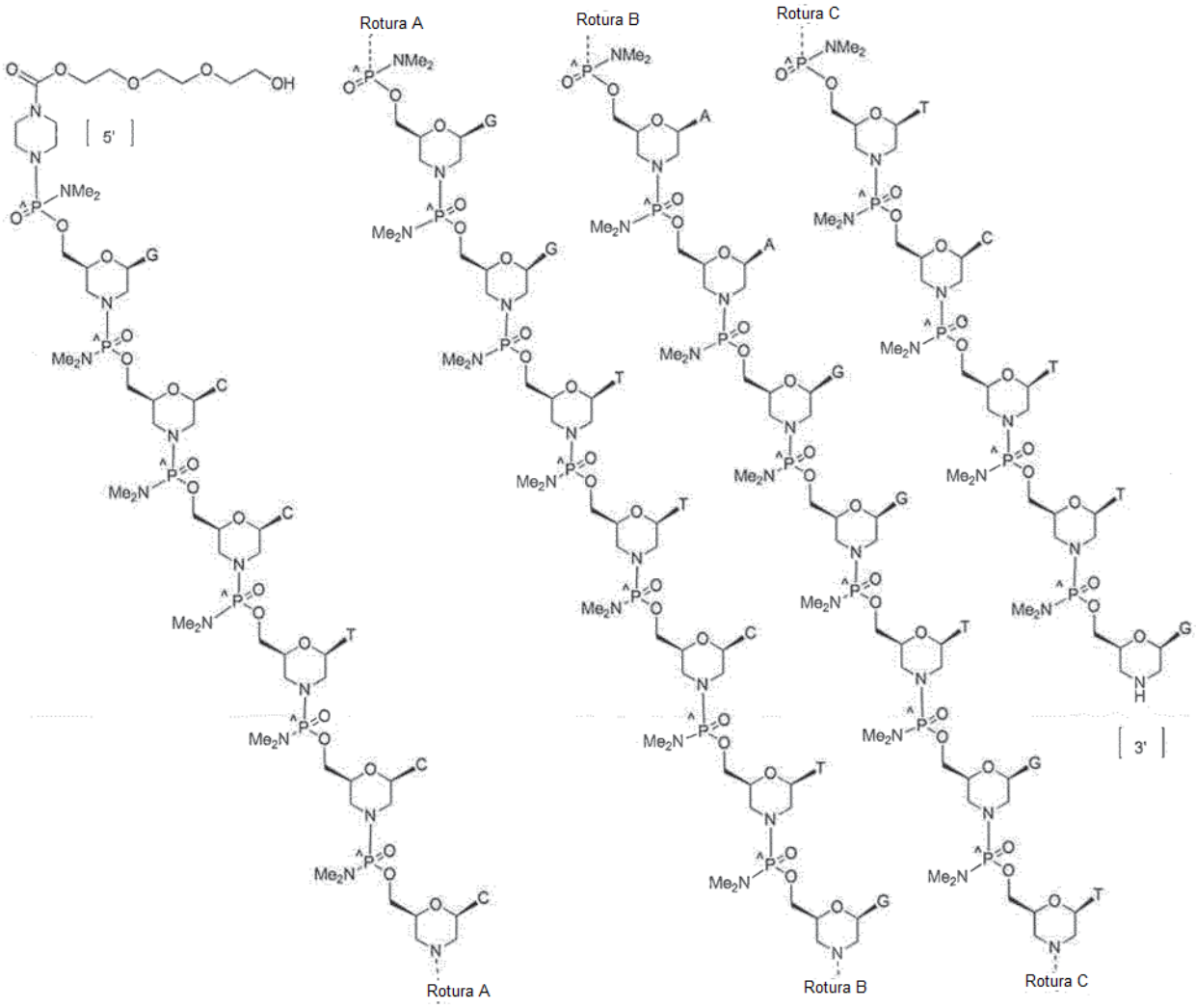
Ejemplo de referencia 5

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, se sintetizó el siguiente PMO, H53A(+30+55), SEQ ID NO: 4 (5'-CTC CGG TTC TGA AGG TGT TCT TGT AC-3') y se usó en los Ejemplos.



Ejemplo de referencia 6

Usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1, se sintetizó el siguiente PMO, H53A(+33+57), SEQ ID NO: 5 (5'-GCC TCC GGT TCT GAA GGT GTT CTT G-3') y se usó en los Ejemplos.



Ejemplo 7

Salto del exón 53

Se diseñó una serie de oligómeros antisentido que se dirigen al exón 53 de la distrofina humana y se sintetizaron de la siguiente manera:

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
H53A(+30+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	2
H53A(+30+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	4
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	6
H53A(+31+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	9

(Las SEQ ID NOs: 2 a 9 no son de acuerdo con la invención)

Los oligómeros antisentido anteriores se evaluaron para determinar la eficacia del salto del exón mediante el tratamiento de los mioblastos humanos primarios en las diferentes concentraciones indicadas. En estos

experimentos, se usaron los oligómeros antisentido correspondientes a H53A(+33+60), y H53A(+31+55) como oligómeros comparativos. Como se muestra en las Figuras 3 y 4, el oligómero H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 1) fue muy efectivo en inducir el salto del exón 53 en células de mioblasto humano primario. H53A(+31+55) (SEQ ID NO: 7) y H53A(+22+46) (SEQ ID NO: 8) también indujeron el salto del exón 53, pero en un menor grado que H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6) y H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 1). Como se muestra en la Figura 3, H53A(+33+60) y H53A(+36+60) (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 1, respectivamente) fueron muy efectivos en inducir el salto del exón 53 en mioblastos cultivados en comparación con otros oligonucleótidos antisentido muy activos.

Los oligómeros antisentido adicionales anteriores se evaluaron para determinar la eficacia del salto del exón mediante el tratamiento de las células RD en las diferentes concentraciones indicadas. En estos experimentos, el oligómero antisentido correspondiente a H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6) se usó como un oligómero comparativo. Como se muestra en la Figura 4, los oligómeros H53A(+30+57), H53A(+30+56), H53A(+30+55) y H53A(+33+57) (SEQ ID NO: 2-5, respectivamente) son comparables en actividad al oligómero H53A(+33+60) (SEQ ID NO: 6).

En otro experimento, un oligómero antisentido de la invención se probó para determinar el salto del exón 53 en mioblastos humanos primarios en comparación con los oligonucleótidos antisentido publicados. Además del H53A(+23+47) (SEQ ID NO: 9) descrito antes, H53A(+39+69), H53A(+39+62), y H53A(+45+69) (SEQ ID NOs: 10, 11, y 12, respectivamente) de la patente US-8.232.384; h53AON1 (+45+62) (SEQ ID NO: 13) del documento WO2004/083446; y PMO3(+32+56) y PMO8(+36+56) (SEQ ID NOs: 14 y 15, respectivamente) del documento WO2012/029986 se compararon con un oligómero ilustrativo de la invención H53A(+36+60) (SEQ ID NO:1). Como se muestra en las Figuras 5A y 5B, se determinó que el oligómero que mostraba la CE_{50} más baja era el H53A(+36+60) SEQ ID NO: 1. Esto se confirmó sometiendo los resultados a un análisis de regresión de tres parámetros dentro del programa GraphPad Prism para generar los valores CE_{50} como se muestra en la siguiente tabla.

	CE_{50}
SEQ ID NO:10 H53A(+39+69)	6,482
SEQ ID NO:9 H53A(+23+47)	9,135
SEQ ID NO:1 H53A(+36+60)	3,910
SEQ ID NO:13 H53A(+45+62)	17,13
SEQ ID NO:11 H53A(+39+62)	6,061
SEQ ID NO:12 H53A(+45+69)	13,11
SEQ ID NO:14 PMO3+32+56	11,80
SEQ ID NO:15 PMO8(+36+56)	15,81

REFERENCIAS

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

Cirak, S., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2011). "Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study." Lancet 378(9791): 595-605.

Dunckley, M. G., I. C. Eperon, et al. (1997). "Modulation of splicing in the DMD gene by antisense oligoribonucleotides." Nucleosides & Nucleotides 16(7-9): 1665-1668.

Dunckley, M. G., M. Manoharan, et al. (1998). "Modification of splicing in the dystrophin gene in cultured Mdx muscle cells by antisense oligoribonucleotides." Hum Mol Genet 7(7): 1083-90.

Errington, S. J., C. J. Mann, et al. (2003). "Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene." J Gene Med 5(6): 518-27.

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

Jearawiriyapaisarn, N., H. M. Moulton, et al. (2008). "Sustained Dystrophin Expression Induced by Peptide-conjugated Morpholino Oligomers in the Muscles of mdx Mice." Mol Ther.

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

Lu, Q. L., C. J. Mann, et al. (2003). "Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse." Nat Med 9(8): 1009-14.

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

Marshall, N. B., S. K. Oda, et al. (2007). "Arginine-rich cell-penetrating peptides facilitate delivery of antisense oligomers into murine leukocytes and alter pre-mRNA splicing." Journal of Immunological Methods 325(1-2): 114-126.

Matsuo, M., T. Masumura, et al. (1991). "Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe." J Clin Invest 87(6): 2127-31.
Monaco, A. P., C. J. Bertelson, et al. (1988). "An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus." Genomics 2(1): 90-5.
Pramono, Z. A., Y. Takeshima, et al. (1996). "Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence." Biochem Biophys Res Commun 226(2): 445-9.
Sazani, P., R. Kole, et al. (2007). Splice switching oligomers for the TNF superfamily receptors and their use in treatment of disease. PCT WO2007058894, University of North Carolina
Sierakowska, H., M. J. Sambade, et al. (1996). "Repair of thalassemic human beta-globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides." Proc Natl Acad Sci U S A 93(23): 12840-4.
Summerton, J. and D. Weller (1997). "Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties." Antisense Nucleic Acid Drug Dev 7(3): 187-95.
Takeshima, Y., H. Nishio, et al. (1995). "Modulation of in vitro splicing of the upstream intron by modifying an intra-exon sequence which is deleted from the dystrophin gene in dystrophin Kobe." J Clin Invest 95(2): 515-20.
van Deutekom, J. C., M. Bremmer-Bout, et al. (2001). "Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells." Hum Mol Genet 10(15): 1547-54.
van Deutekom, J. C., A. A. Janson, et al. (2007). "Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051." N Engl J Med 357(26): 2677-86.
Wilton, S. D., A. M. Fall, et al. (2007). "Antisense oligonucleotide-induced exon skipping across the human dystrophin gene transcript." Mol Ther 15(7): 1288-96.
Wilton, S. D., F. Lloyd, et al. (1999). "Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides." Neuromuscul Disord 9(5): 330-8.
Wu, B., H. M. Moulton, et al. (2008). "Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer." Proc Natl Acad Sci U S A 105(39): 14814-9.
Yin, H., H. M. Moulton, et al. (2008). "Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function." Hum Mol Genet 17(24): 3909-18.

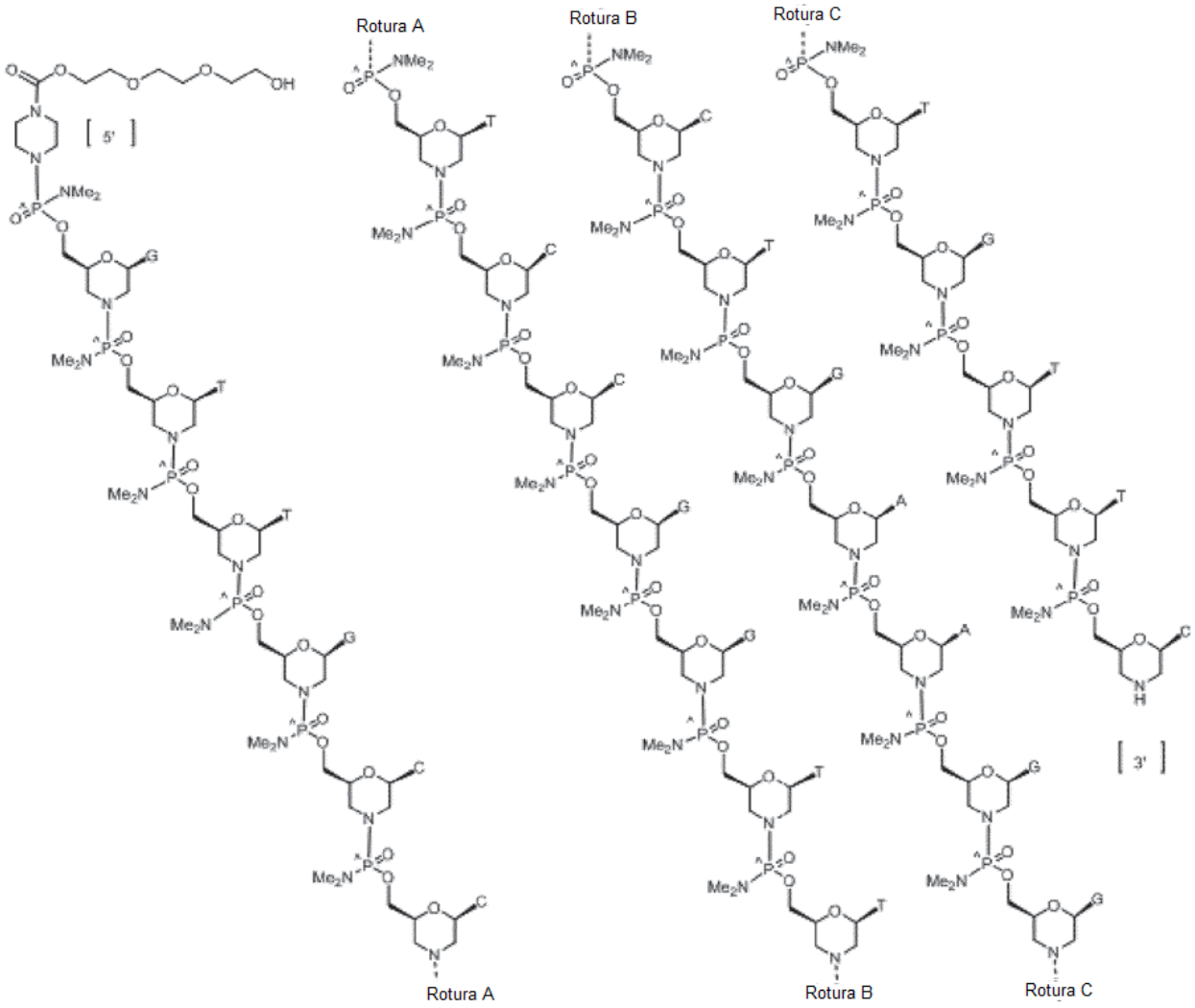
LISTADO DE SECUENCIAS

Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
H53A(+36+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	1
H53A(+30+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	2
H53A(+30+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	3
H53A(+30+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC	4
H53A(+33+57)	GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	5
H53A(+33+60)	GTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG	6
h53A(+31+55)	CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA	7
H53A(+22+46)	TGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCCC	8
H53A(+23+47)	CTGAAGGTGTTCTTGTACTTCATCC	9
H53 (+39+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	10
H53(+39+62)	CTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTG	11
H53 (+45+69)	CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTG	12
H53 (+45+62)	CTGTTGCCTCCGGTTCTG	13
PM03(+32+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT	14
PMO8(+36+56)	CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC	15
rTAT	RRRQRRKKR	16
Tat	RKKRRQRRR	17
R_9F_2	RRRRRRRRRFF	18
$R_5F_2R_4$	RRRRRFFRRRR	19
R_4	RRRR	20
R_5	RRRRR	21
R_6	RRRRRR	22
R_7	RRRRRRR	23
R_8	RRRRRRRR	24

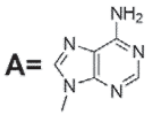
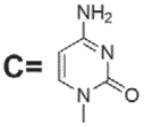
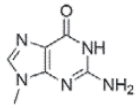
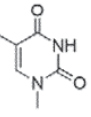
Descripción	Secuencia	SEQ ID NO
R_9	RRRRRRRRR	25
$(RX)_8$	RXRXRXRXRXRXRX	26
$(RAhxR)_4$; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	27
$(RAhxR)_5$; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	28
$(RAhxRRBR)_2$; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	29
$(RAR)_4F_2$	RARRARRARRARFF	30
$(RGR)_4F_2$	RGRRGRRGRRGRFF	31
Primer	CTTGGACAGAACTTACCGACTGG	32
Primer	GTTTCTTCCAAAGCAGCCTCTCG	33
Primer	GCAGGATTTGGAACAGAGGCG	34
Primer	CATCTACATTTGTCTGCCACTGG	35

REIVINDICACIONES

1. Un nucleótido antisentido que tiene la siguiente estructura:



en la que

A=  , C=  , G=  , y T=m^{5}U=  ,

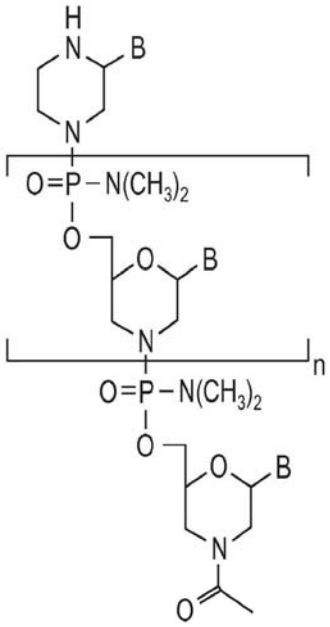
y

en la que ^ = la estereoquímica del centro de fósforo no está definida; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Una composición farmacéutica que comprende el oligonucleótido antisentido de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. La composición de la reivindicación 2 para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

FIG. 1A



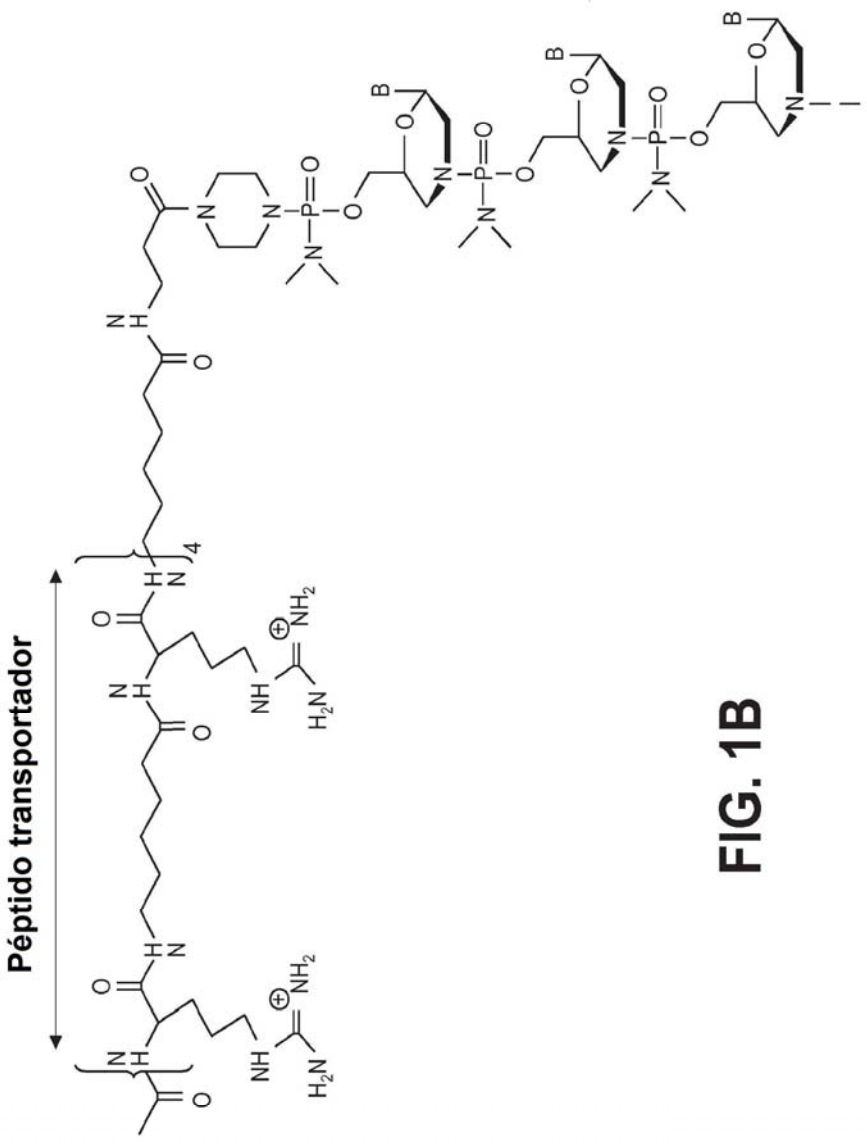


FIG. 1B

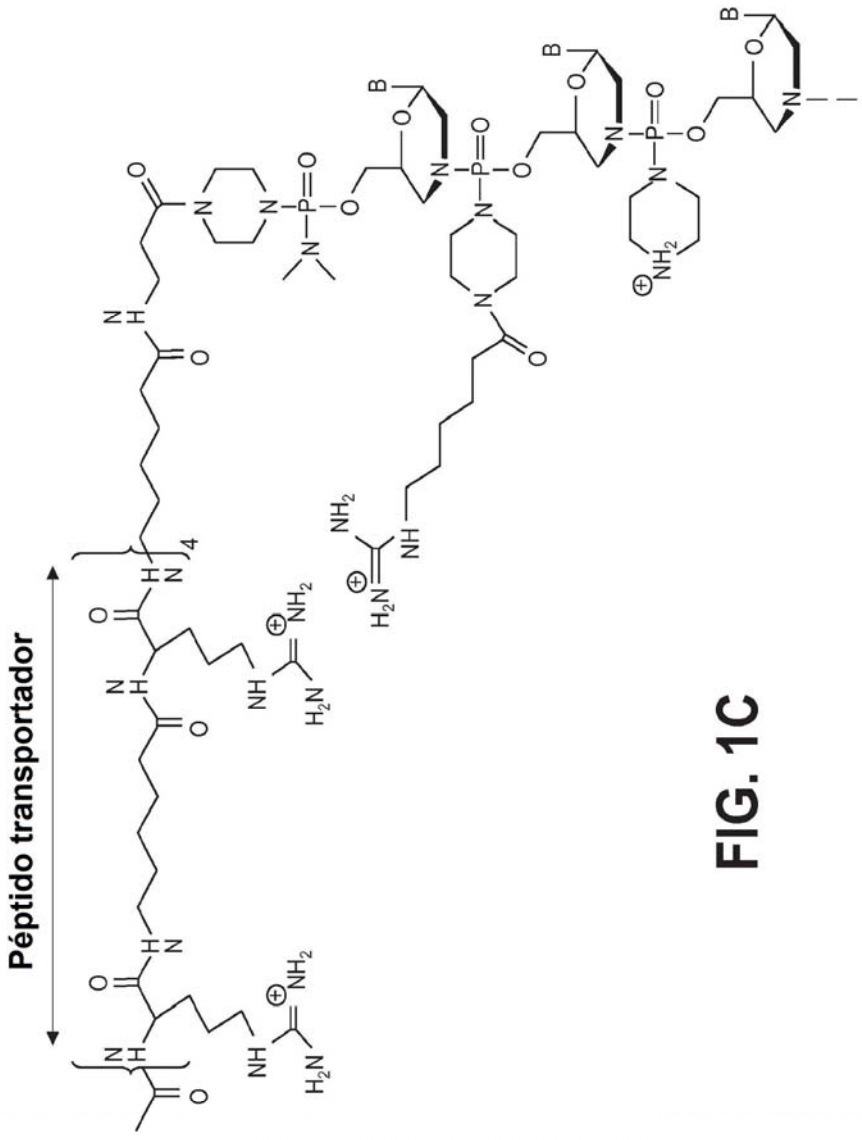


FIG. 1C

FIG. 1D

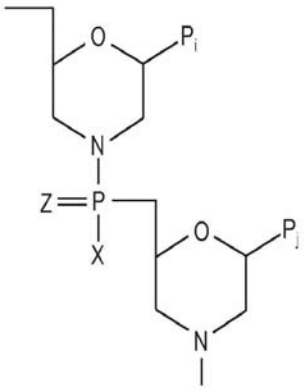


FIG. 1E

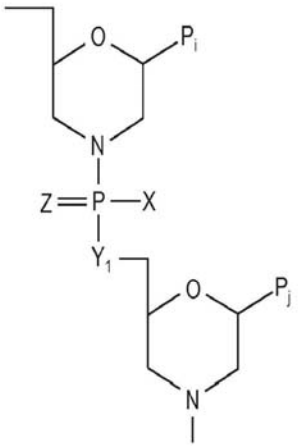


FIG. 1F

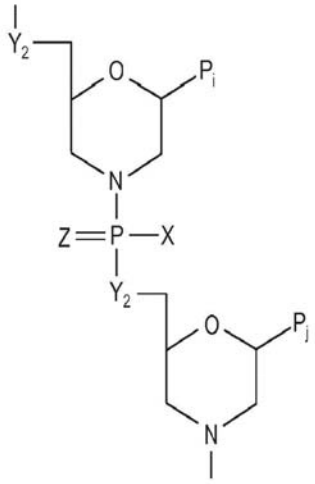
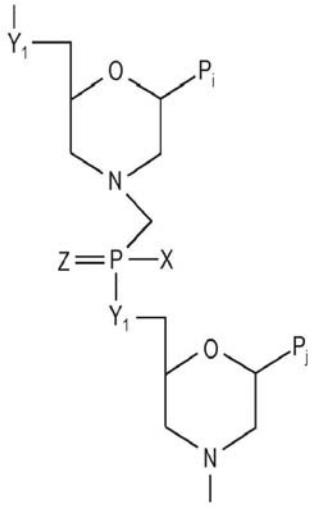


FIG. 1G



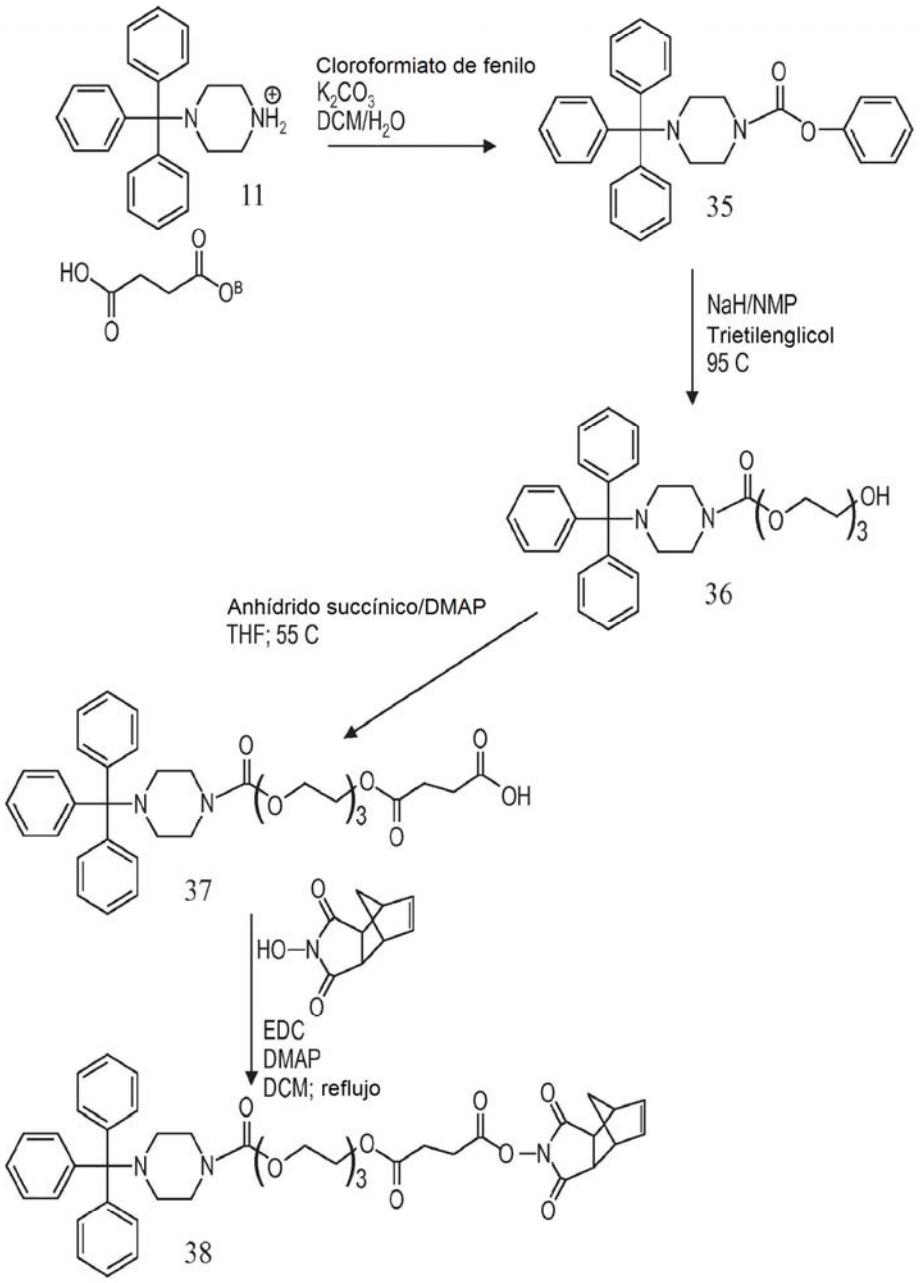

Cloroformiato de fenilo
K_2CO_3
DCM/H_2O
11
35
NaH/NMP
Trietilenglicol
95 C
36
Anhídrido succínico/DMAP
THF; 55 C
37
EDC
DMAP
DCM; reflujo
38

FIG. 2A

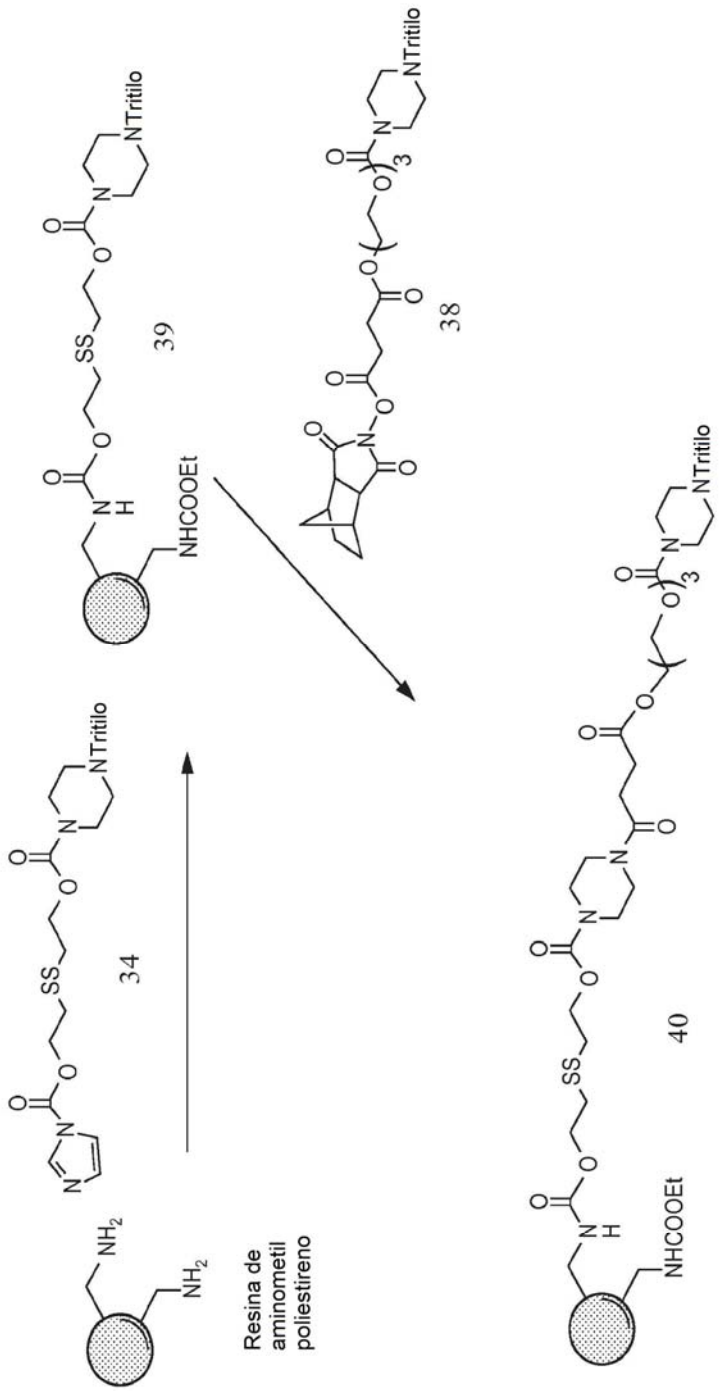

Resina de aminometil poliestireno
34
39
38
40
NTritilo
NHCOOEt
SS

FIG. 2B

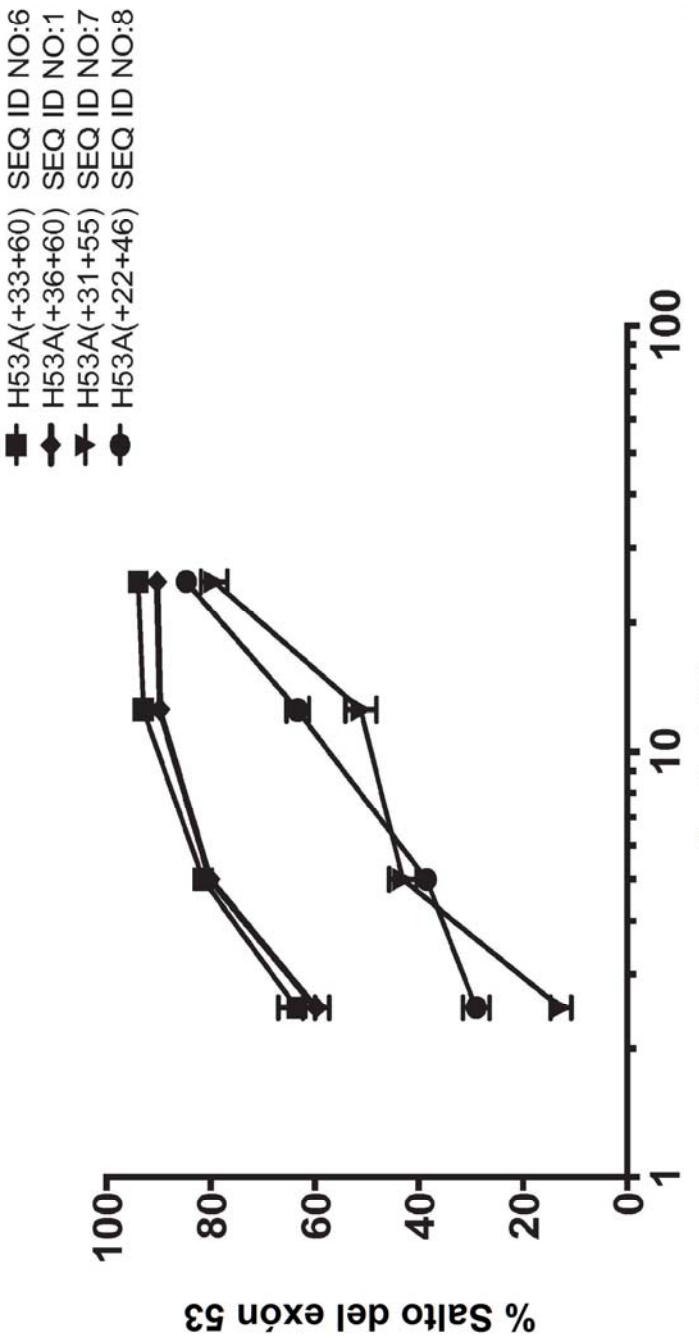

H53A(+33+60) SEQ ID NO:6
H53A(+36+60) SEQ ID NO:1
H53A(+31+55) SEQ ID NO:7
H53A(+22+46) SEQ ID NO:8
% Salto del exón 53
100
80
60
40
20
0
1
10
100
Dosis (µM)

FIG. 3

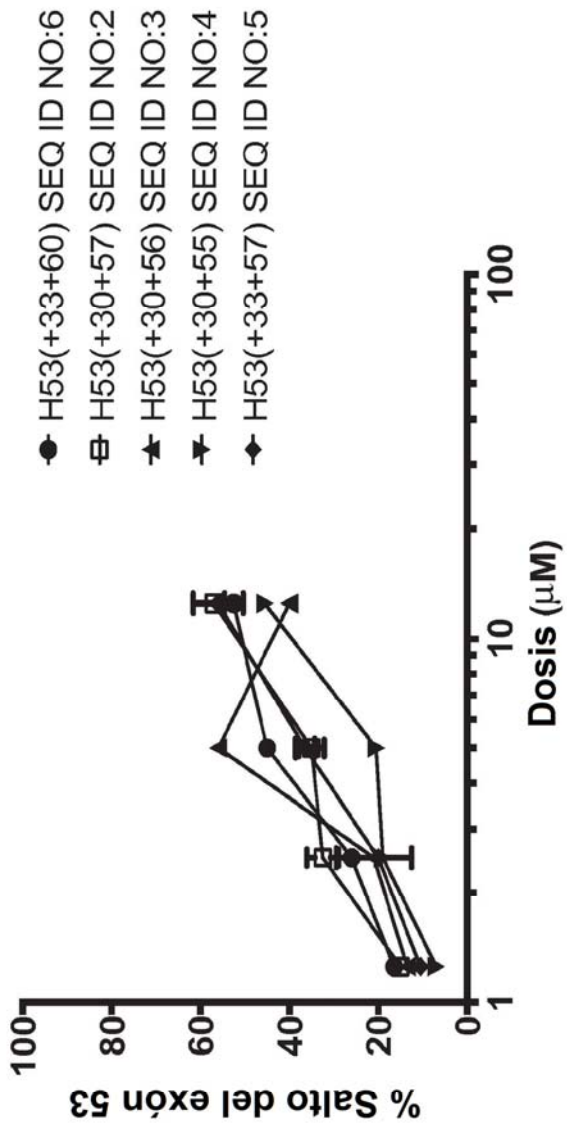

H53(+33+60) SEQ ID NO:6
H53(+30+57) SEQ ID NO:2
H53(+30+56) SEQ ID NO:3
H53(+30+55) SEQ ID NO:4
H53(+33+57) SEQ ID NO:5
% Salto del exón 53
0
20
40
60
80
100
1
10
100
Dosis (µM)

FIG. 4

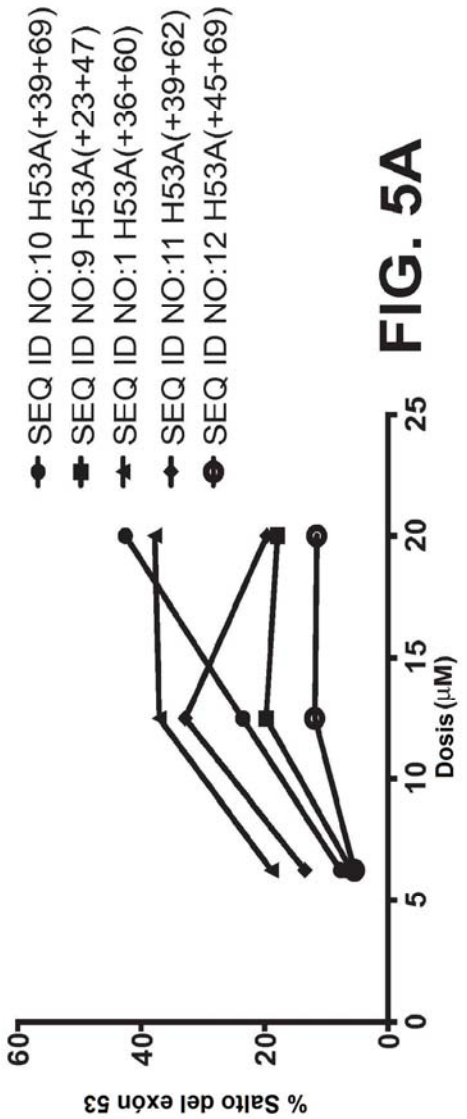

SEQ ID NO:10 H53A(+39+69)
SEQ ID NO:9 H53A(+23+47)
SEQ ID NO:1 H53A(+36+60)
SEQ ID NO:11 H53A(+39+62)
SEQ ID NO:12 H53A(+45+69)
% Salto del exón 53
Dosis (µM)
0
20
40
60
0
5
10
15
20
25

FIG. 5A

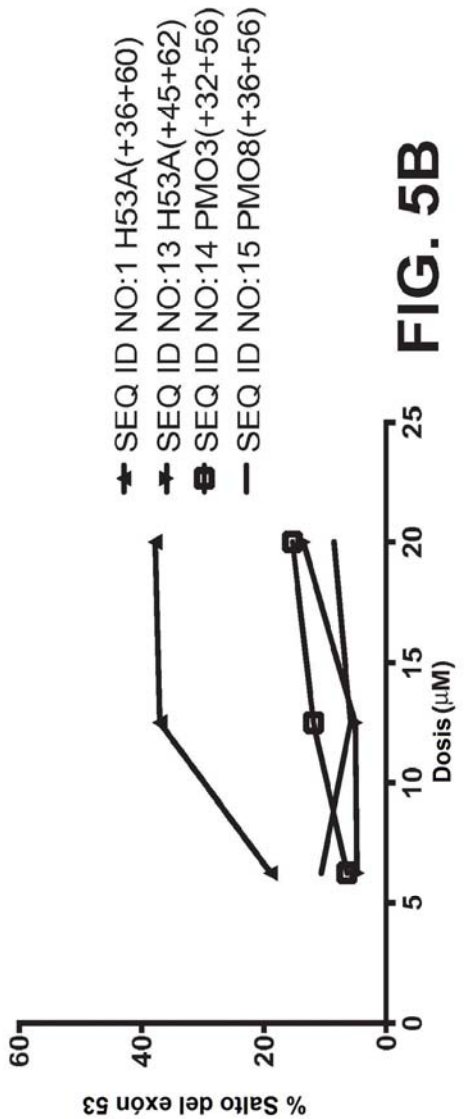

SEQ ID NO:1 H53A(+36+60)
SEQ ID NO:13 H53A(+45+62)
SEQ ID NO:14 PMO3(+32+56)
SEQ ID NO:15 PMO8(+36+56)
% Salto del exón 53
Dosis (µM)
0
20
40
60
0
5
10
15
20
25

FIG. 5B