

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 901 772**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50	(2007.01)	A61P 43/00	(2006.01)
A61P 21/00	(2006.01)		
A61P 31/16	(2006.01)		
A61K 47/58	(2007.01)		
A61K 47/64	(2007.01)		
A61P 25/00	(2006.01)		
A61P 31/00	(2006.01)		
A61P 31/04	(2006.01)		
A61P 31/06	(2006.01)		
A61P 31/12	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2016 PCT/US2016/066595**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **22.06.2017 WO17106304**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2016 E 16876554 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.11.2021 EP 3389719**

54 Título: **Conjugados de péptido oligonucleótido**

30 Prioridad:

15.12.2015 US 201562267723 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HANSON, GUNNAR, J. y
ZHOU, MING**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 901 772 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de péptido oligonucleótido

5 Listado de secuencias

La presente solicitud se presenta junto con un listado de secuencias en formato legible por ordenador. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado 586558SPT-002PC_SL.txt, creado el 13 de diciembre de 2016, que tiene un tamaño de 4.076 bytes.

10

Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reclama el beneficio de la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense núm. 62/267,723, presentada el 15 de diciembre de 2015.

15

Antecedentes de la invención

20

La tecnología antisentido proporciona un medio para modular la expresión de uno o más productos génicos específicos, incluidos los productos de corte y empalme alternativo, y es especialmente útil en una serie de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico y de investigación. El principio en el que se basa la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido, por ejemplo, un oligonucleótido, que se hibrida con un ácido nucleico objetivo, modula las actividades de expresión de los genes, como la transcripción, el corte y empalme o la traducción, a través de cualquiera de los diversos mecanismos antisentido. La especificidad de secuencia de los compuestos antisentido los hace atractivos como herramientas para la validación de objetivos y la funcionalización de genes, así como para la terapéutica para modular selectivamente la expresión de genes implicados en enfermedades.

25

30

Aunque se han realizado avances significativos en el campo de la tecnología antisentido, sigue existiendo la necesidad de contar con oligonucleótidos y conjugados de péptido-oligonucleótido con un rendimiento antisentido o antigénico mejorado. Dicho rendimiento antisentido o antigénico mejorado incluye, al menos, por ejemplo: una menor toxicidad, una mayor afinidad por el ADN y el ARN sin comprometer la selectividad de la secuencia, una farmacocinética y una distribución tisular mejoradas, una entrega celular mejorada y una distribución *in vivo* fiable y controlable.

35

Los documentos WO 2014/144978 y EP 2623507A describen conjugados de péptido-oligonucleótido. Sazani et al. *Int. J Toxicol.* 2011, 30(2), 313-321 describen el oligonucleótido antisentido AVL4658 (eteplirsén). El documento WO 2016/138534 (que se publicó después de la fecha de prioridad de la presente solicitud) también describe conjugados de péptido-oligonucleótido. Todos ellos difieren de los de la presente solicitud, al menos, en el grupo enlazador definido en la presente como R¹².

40

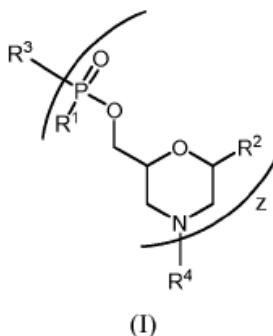
Breve descripción de la invención

45

En la presente se proporcionan conjugados de péptido-oligómero. También se proporcionan en la presente métodos de tratamiento de una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo, que comprenden administrar al sujeto un conjugado de péptido-oligómero de la divulgación.

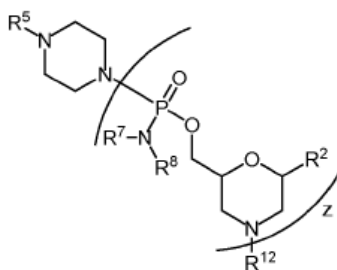
50

En consecuencia, en un aspecto, se proporciona en la presente un conjugado de péptido-oligonucleótido de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R¹, R², R³, R⁴, y z son como se definen en la presente.

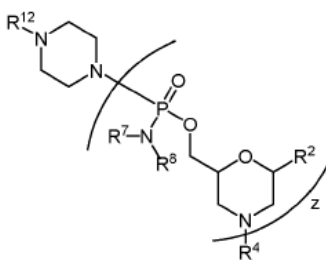
En una realización, el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ia:



(Ia)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^2 , R^5 , R^7 , R^8 , R^{12} y z son como se definen en la presente.

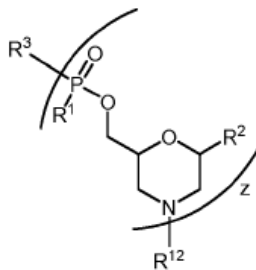
5 En otra realización, el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ib:



(Ib)

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^2 , R^5 , R^7 , R^8 , R^{12} y z son como se definen en la presente.

10 En aún otra realización, el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ic:



(Ic)

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^1 , R^2 , R^3 , R^{12} , y z son como se definen en la presente.

En otro aspecto, se proporciona en la presente conjugados de péptido-oligómero como se define anteriormente para su uso en tratar un trastorno del sistema nervioso central, una enfermedad muscular, una infección viral o una infección bacteriana en un sujeto en necesidad del mismo.

20 Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un esquema sintético general utilizado para preparar el PPMO-5 y PPMO-1.

25 La figura 2 muestra un esquema sintético general utilizado para preparar el PPMO-4.

La figura 3 muestra que el % de omisión del exón 23 de un enlazador PEG-3 ha mejorado la eficacia en comparación con otros enlazadores descritos en la presente (QC = cuádriceps, HT = corazón, DP = diafragma).

30 La figura 4 muestra que el % de omisión del exón 23 de un enlazador Apa o de todos los aminoácidos D ha mejorado la eficacia en comparación con el PPMO-8.

La figura 5 compara la eficacia del compuesto enlazador PEG-3 en comparación con el PPMO-2 y el PPMO-8.

La figura 6 muestra los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN, por sus siglas en inglés) en varios niveles de dosificación de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación. Los niveles de BUN aumentan en comparación

con el PPMO-8.

La figura 7 muestra los niveles de química sérica de alanina aminotransferasa (ALT, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, triglicéridos, creatinina y aspartato aminotransferasa (AST, por sus siglas en inglés) a varios niveles de dosificación de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación (las líneas discontinuas/regiones sombreadas representan la media y la SD (desviación estándar), respectivamente, de la base de datos interna sin tratar).

La figura 8 muestra los niveles químicos séricos de cloruro, fósforo, potasio y sodio a varios niveles de dosificación de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación (las líneas discontinuas/regiones sombreadas representan la media y la SD, respectivamente, de la base de datos interna sin tratar).

La figura 9 muestra los niveles de KIM-1 en varios niveles de dosificación de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación (las líneas discontinuas/regiones sombreadas representan la media y la SD, respectivamente, de la base de datos interna sin tratar).

La figura 10 compara el % de omisión del exón 23 y los niveles de KIM-1 del PPMO-4, PPMO-2 y PPMO-8.

Descripción detallada de la invención

En la presente se proporcionan conjugados de péptido-oligómero. También se proporcionan en la presente métodos de tratamiento de una enfermedad en un sujeto en necesidad del mismo, que comprenden administrar al sujeto un conjugado de péptido-oligonucleótido de la divulgación. Los oligómeros, y por ende los conjugados de péptido-oligómero, descritos en la presente muestran una mayor afinidad por el ADN y el ARN sin comprometer la selectividad de la secuencia, en relación con los oligonucleótidos nativos o no modificados. En algunas realizaciones, los oligómeros de la divulgación minimizan o impiden la escisión por la RNasa H. En algunas realizaciones, los oligómeros antisentido de la divulgación no activan la RNasa H.

Los péptidos descritos en la presente imparten a sus correspondientes conjugados de péptido-oligómero una menor toxicidad, potencian la actividad del oligómero, mejoran la farmacocinética y la distribución tisular, mejoran el suministro celular e imparten una distribución *in vivo* fiable y controlable.

Definiciones

A continuación, se enlistan las definiciones de varios términos utilizados para describir esta divulgación. Estas definiciones se aplican a los términos tal y como se utilizan a lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones, a menos que se limiten a casos específicos, ya sea individualmente o como parte de un grupo más amplio.

El término "aproximadamente" será entendido por las personas con conocimientos ordinarios en la técnica y variará en cierta medida según el contexto en el que se utilice. Tal como se utiliza en la presente se refiere a un valor medible, como una cantidad, una duración temporal y similares, el término "aproximadamente" pretende abarcar variaciones de $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$, incluyendo $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ y $\pm 0,1\%$ del valor especificado, ya que tales variaciones son apropiadas para realizar los métodos divulgados.

El término "alquilo" se refiere a las porciones de hidrocarburos saturados de cadena lineal o ramificada que contienen, en ciertas realizaciones, entre uno y seis, o uno y ocho átomos de carbono, respectivamente. Los ejemplos de la porción de alquilo de C_{1-6} incluyen, pero no se limitan a, las porciones de metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, neopentilo y *n*-hexilo; y los ejemplos de las porciones de alquilo de C_{1-8} incluyen, pero no se limitan a, las porciones de metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, *tert*-butilo, neopentilo, *n*-hexilo, heptilo y octilo.

El número de átomos de carbono en un sustituyente alquilo puede indicarse con el prefijo " C_{x-y} ", en donde x es el número mínimo e y es el número máximo de átomos de carbono en el sustituyente. Asimismo, una cadena C_x significa una cadena de alquilo que contiene x átomos de carbono.

El término "heteroalquilo" por sí mismo o en combinación con otro término significa, a menos que se indique lo contrario, un grupo alquilo estable de cadena lineal o ramificada compuesto por el número indicado de átomos de carbono y uno o dos heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en O, N y S, y en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los heteroátomos pueden colocarse en cualquier posición del grupo heteroalquilo, incluso entre el resto del grupo heteroalquilo y el fragmento al que se une, así como unido al átomo de carbono más distal del grupo heteroalquilo. Los ejemplos incluyen: $-O-CH_2-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-CH_2-OH$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, y $-CH_2-CH_2-S(=O)-CH_3$. Hasta dos heteroátomos pueden ser consecutivos, como, por ejemplo, $-CH_2-NH-OCH_3$, o $-CH_2-CH_2-S-S-CH_3$.

El término "arilo", empleado solo o en combinación con otros términos, significa, a menos que se indique lo contrario, un sistema aromático carbocíclico que contiene uno o más anillos (normalmente uno, dos o tres anillos), en donde dichos anillos pueden estar unidos de forma colgante, como un bifenilo, o pueden estar fusionados, como el naftaleno. Los ejemplos de grupos arilo incluyen el fenilo, el antracilo y el naftaleno. En diversas realizaciones, los ejemplos de un grupo

arilo pueden incluir fenilo (por ejemplo, arilo de C₆) y bifenilo (por ejemplo, arilo de C₁₂). En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de seis a dieciséis átomos de carbono. En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de seis a doce átomos de carbono (por ejemplo, arilo de C₆₋₁₂). En algunas realizaciones, los grupos arilo tienen de seis a doce átomos de carbono (por ejemplo, arilo de C₆).

5 Como se utiliza en la presente, el término "heteroarilo" o "heteroaromático" se refiere a un heterociclo que tiene carácter aromático. Los sustituyentes heteroarilo pueden definirse por el número de átomos de carbono, por ejemplo, heteroarilo de C₁₋₉ indica el número de átomos de carbono contenidos en el grupo heteroarilo sin incluir el número de heteroátomos. Por ejemplo, un heteroarilo de C₁₋₉ incluirá de uno a cuatro heteroátomos adicionales. Un heteroarilo policíclico puede
10 incluir uno o más anillos parcialmente saturados. Ejemplos no limitantes de heteroarilos incluyen piridilo, pirazinilo, pirimidinilo (incluyendo, por ejemplo, 2- y 4-pirimidinilo), piridazinilo, tienilo, furilo, pirrolilo (incluyendo, por ejemplo, 2-pirrolilo), imidazolilo, tiazolilo, oxazolilo, pirazolilo (incluyendo, por ejemplo, 3- y 5-pirazolilo), isotiazolilo, 1,2,3-triazolilo, 1,2,4-triazolilo, 1,3,4-triazolilo, tetrazolilo, 1,2,3-tiadiazolilo, 1,2,3-oxadiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo y 1,3,4-oxadiazolilo.

15 Ejemplos no limitantes de heterociclos y heteroarilos policíclicos incluyen indolilo (incluyendo, por ejemplo, 3-, 4-, 5-, 6- y 7-indolilo), indolinilo, quinolilo, tetrahydroquinolilo, isoquinolilo (incluyendo, por ejemplo, 1- y 5-isoquinolilo), 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolilo, cinolinilo, quinoxalinilo (incluyendo, por ejemplo, 2- y 5-quinoxalinilo), quinazolinilo, ftalazinilo, 1,8-naftiridinilo, 1,4-benzodioxanilo, cumarina, dihidrocumarina, 1,5-naftiridinilo, benzofurilo (incluyendo, por ejemplo, 3-, 4-, 5-, 6- y 7-benzofurilo), 2,3-dihidrobenzofurilo, 1,2-benzoxazolilo, benzotienilo (incluyendo, por ejemplo, 3-, 4-, 5-, 6- y 7-
20 benzotienilo), benzoxazolilo, benzotiazolilo (incluyendo, por ejemplo, 2-benzotiazolilo y 5-benzotiazolilo), purinilo, bencimidazolilo (incluyendo, por ejemplo, 2-benzotiazolilo), benzotriazolilo, tioxantínilo, carbazolilo, carbolinilo, acridinilo, pirrolizidinilo y quinolizidinilo.

25 El término "grupo protector" o "grupo protector químico" se refiere a las porciones químicas que bloquean algunas o todas las porciones reactivas de un compuesto e impiden que dichas porciones reactivas participen en reacciones químicas hasta que se elimine el grupo protector, por ejemplo, las porciones enlistadas y descritas en T.W. Greene, P.G.M. Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd ed. John Wiley & Sons (1999). Puede ser ventajoso, cuando se emplean diferentes grupos protectores, que cada grupo protector (diferente) sea removible por un medio diferente. Los grupos protectores que se escinden en condiciones de reacción totalmente dispares permiten la eliminación diferencial de dichos
30 grupos protectores. Por ejemplo, los grupos protectores pueden eliminarse mediante ácido, base e hidrogenólisis. Los grupos como el trítill, el monometoxitritill, el dimetoxitritill, el acetal y el *terc*-butildimetilsililo son lábiles al ácido y pueden utilizarse para proteger las porciones carboxílicas e hidroxílicas en presencia de grupos aminos protegidos con grupos Cbz, que pueden eliminarse por hidrogenólisis, y grupos Fmoc, que son lábiles a la base. Las porciones de ácido carboxílico pueden bloquearse con grupos lábiles a la base como, sin limitación, el metilo o el etilo, y las porciones reactivas al hidroxilo pueden bloquearse con grupos lábiles a la base como el acetilo en presencia de aminas bloqueadas con grupos lábiles al ácido como el carbamato de *terc*-butilo o con carbamatos que son estables tanto al ácido como a la base, pero eliminables hidrolíticamente.

40 El ácido carboxílico y las porciones reactivas de hidroxilo también pueden bloquearse con grupos protectores extraíbles hidrolíticamente, como el grupo bencilo, mientras que los grupos de amina pueden bloquearse con grupos lábiles a la base, como Fmoc. Un grupo protector de amina particularmente útil para la síntesis de compuestos de Fórmula (I) es la trifluoroacetamida. Las porciones reactivas del ácido carboxílico pueden bloquearse con grupos protectores oxidables como el 2,4-dimetoxibencil, mientras que los grupos amino coexistentes pueden bloquearse con carbamatos de sililo lábiles al flúor.

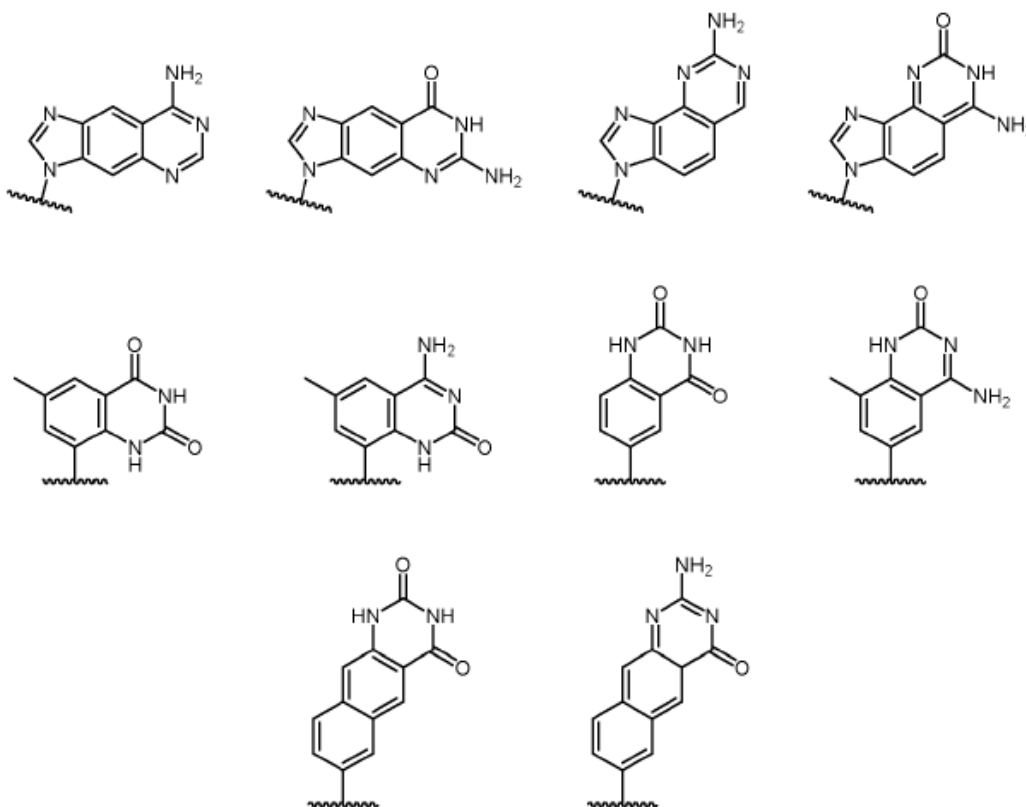
45 Los grupos bloqueadores de alilo son útiles en presencia de grupos protectores de ácidos y bases, ya que los primeros son estables y pueden eliminarse posteriormente mediante catalizadores metálicos o pi-ácidos. Por ejemplo, un ácido carboxílico bloqueado por alilo puede desprotegerse con una reacción catalizada por paladio(O)- en presencia de grupos protectores de carbamato de *t*-butilo lábiles al ácido o de acetato de amina lábiles a la base. Otra forma de grupo protector es una resina a la que se puede unir un compuesto o intermedio. Mientras el residuo esté unido a la resina, ese grupo funcional está bloqueado y no puede reaccionar. Una vez liberado de la resina, el grupo funcional está disponible para reaccionar.

55 El término "nucleobase", "porción de acoplamiento de la base", "porción de acoplamiento de la nucleobase" o "base" se refiere a la porción de anillo heterocíclico de una subunidad de nucleósido, nucleótido y/o morfolino. Las nucleobases pueden ser naturales, o pueden ser modificadas o análogas a estas nucleobases naturales, por ejemplo, uno o más átomos de nitrógeno de la nucleobase pueden ser sustituidos independientemente en cada caso por carbono. Los análogos ejemplares incluyen la hipoxantina (el componente base del nucleósido inosina); la 2, 6-diaminopurina; la 5-metil citosina; las pirimidinas modificadas con C5-propinilo; el 10-(9-(aminoetoxi)fenoxazinilo) (abrazadera G) y similares.

60 Otros ejemplos de porciones de emparejamiento de bases incluyen, pero no se limitan a, uracilo, timina, adenina, citosina, guanina e hipoxantina (inosina) con sus respectivos grupos amino protegidos por grupos protectores de acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-iodouracilo, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de la pirimidina como la pseudoisocitina y el pseudouracilo y otras nucleobases modificadas como las purinas 8-sustituidas, la xantina o la hipoxantina (estas dos últimas son los productos naturales de degradación). Las nucleobases modificadas divulgadas en Chiu y Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196 y Revankar y

Rao, *Comprehensive Natural Products Chemistry*, vol. 7, 313, también se contemplan.

Otros ejemplos de porciones de emparejamiento de bases incluyen, pero no se limitan a, nucleobases de tamaño expandido en las que se han añadido uno o más anillos de benceno. La sustituciones de bases nucleicas descritas en el catálogo de Glen Research (www.glenresearch.com); Krueger AT et al, *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 141-150; Kool, ET, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7, 723-733; Hirao, I., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 622-627, se contemplan como útiles para la síntesis de los oligómeros descritos en la presente. A continuación, se muestran ejemplos de nucleobases de tamaño expandido:



Los términos “oligonucleótido” u “oligómero” se refieren a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos enlazados, nucleótidos, o una combinación de ambos nucleósidos y nucleótidos. En las realizaciones específicas proporcionadas en la presente, un oligonucleótido es un oligonucleótido morfolino.

La frase “oligonucleótido morfolino” o “PMO” se refiere a un oligonucleótido modificado que tiene subunidades morfolinas unidas entre sí por enlaces de fosoramidato o fosfordiamidato, uniendo el nitrógeno morfolino de una subunidad al carbono 5'-exocíclico de una subunidad adyacente. Cada subunidad de morfolino comprende una porción de emparejamiento de nucleobase efectiva para unirse, por enlace de hidrógeno específico de nucleobase, a una nucleobase en un objetivo.

Los términos “oligómero antisentido”, “compuesto antisentido” y “oligonucleótido antisentido” se utilizan indistintamente y se refieren a una secuencia de subunidades, cada una de ellas con una porción de acoplamiento de bases, unidas por enlaces intersubunitarios que permiten que las porciones de acoplamiento de bases se hibriden con una secuencia objetivo en un ácido nucleico (normalmente un ARN) mediante el acoplamiento de bases Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia objetivo. El oligómero puede tener una complementariedad de secuencia exacta (perfecta) o casi (suficiente) con la secuencia objetivo; las variaciones en la secuencia cerca de los terminales de un oligómero son generalmente preferibles a las variaciones en el interior.

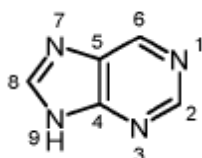
Un oligómero antisentido de este tipo puede diseñarse para bloquear o inhibir la traducción del ARNm o para inhibir/alterar el procesamiento de corte y empalme natural o anormal del pre-ARNm, y puede decirse que está “dirigido a” o “dirigido contra” una secuencia objetivo con la que se hibrida. La secuencia objetivo suele ser una región que incluye un codón de inicio AUG de un ARNm, un oligómero supresor de la traducción, o un sitio de corte y empalme de un ARNm preprocesado, un oligómero supresor del corte y empalme (SSO). La secuencia objetivo para un sitio de corte y empalme puede incluir una secuencia de ARNm que tenga su extremo 5' entre 1 y aproximadamente 25 pares de bases cadena abajo de una unión aceptora de corte y empalme normal en un ARNm preprocesado. En diversas realizaciones, una secuencia objetivo

puede ser cualquier región de un ARNm preprocesado que incluya un sitio de corte y empalme o esté contenida por completo dentro de una secuencia codificadora de exón o abarque un sitio aceptor o donante de corte y empalme. En general, se dice que un oligómero está "dirigido contra" un objetivo biológicamente relevante, como una proteína, un virus o una bacteria, cuando está dirigido contra el ácido nucleico del objetivo de la manera descrita anteriormente.

5 El oligonucleótido antisentido y el ARN objetivo son complementarios entre sí cuando un número suficiente de posiciones correspondientes en cada porción están ocupadas por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí, de manera que se produce una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el objetivo. Por lo tanto, "específicamente hibridable" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de manera que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el objetivo. Se entiende en la técnica que la secuencia de un oligonucleótido no necesita ser 100 % complementaria a la de su secuencia objetivo para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la molécula objetivo interfiere con la función normal del ARN objetivo, y hay un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido antisentido a secuencias no objetivo en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobase (a menudo denominadas en la técnica simplemente "base"). Los oligonucleótidos que contienen una base modificada o sustituida incluyen oligonucleótidos en los que una o más bases de purina o pirimidina que se encuentran comúnmente en los ácidos nucleicos se sustituyen por bases menos comunes o no naturales. En algunas realizaciones, la nucleobase está unida covalentemente en el átomo N9 de la base de purina, o en el átomo N1 de la base de pirimidina, al anillo de morfolina de un nucleótido o nucleósido.

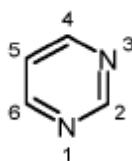
25 Las bases de purina comprenden un anillo de pirimidina fusionado a un anillo de imidazol, como se describe en la fórmula general:



Purina

30 La adenina y la guanina son las dos nucleobases de purina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos. Éstas pueden ser sustituidas por otras purinas naturales, incluyendo, pero no limitándose a la N6-metiladenina, N2-metilguanina, hipoxantina y 7-metilguanina.

Las bases de pirimidina comprenden un anillo de pirimidina de seis miembros según la fórmula general:



Pirimidina

35 La citosina, el uracilo y la timina son las bases de pirimidina que se encuentran más comúnmente en los ácidos nucleicos. Éstas pueden ser sustituidas por otras pirimidinas naturales, incluyendo, pero no limitándose a la 5-metilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, pseudouracilo y 4-tiouracilo. En una realización, los oligonucleótidos descritos en la presente contienen bases de timina en lugar de uracilo.

Otras bases modificadas o sustituidas incluyen, pero no se limitan a, 2,6-diaminopurina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, 2-tiopirimidina (por ejemplo, 2-tiouracilo, 2-tiotimina), abrazadera G y derivados de los mismos, 5-pirimidina sustituida (por ejemplo, 5-halouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 7-deazaguanina 7-deazaadenina, 7-aza-2,6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-2,6-diaminopurina, Super G, Super A, y N4-etilcitosina, o derivados de los mismos; N2-ciclopentilguanina (cPent-G), N2-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP), y N2-propil-2-aminopurina (Pr-AP), pseudouracilo o derivados de los mismos; y bases degeneradas o universales, como el 2,6-difluorotolueno o bases ausentes como los sitios abásicos (por ejemplo, 1-desoxirribosa, 1,2-dideoxirribosa, 1-deoxi-2-O-metilribosa; o derivados de la pirrolidina en los que el oxígeno del anillo ha sido sustituido por nitrógeno (azaribosa)). El pseudouracilo es una versión isomerizada natural del uracilo, con un glicósido C en lugar del glicósido N habitual de la uridina.

55 Ciertas nucleobases modificadas o sustituidas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los oligonucleótidos antisentido de la divulgación. Estas incluyen pirimidinas-5 sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-

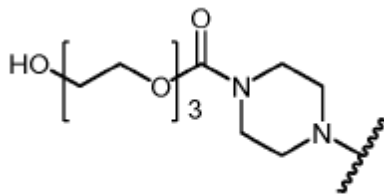
6 y 0-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. En varias realizaciones, las nucleobases pueden incluir sustituciones de 5-metilcitosina, que se ha demostrado que aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C.

5 En algunas realizaciones, las nucleobases modificadas o sustituidas son útiles para facilitar la purificación de los oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido pueden contener tres o más (por ejemplo, 3, 4, 5, 6 o más) bases de guanina consecutivas. En ciertos oligonucleótidos antisentido, una cadena de tres o más bases de guanina consecutivas puede dar lugar a la agregación de los oligonucleótidos, complicando la purificación. En tales oligonucleótidos antisentido, una o más de las guaninas consecutivas pueden ser sustituidas por inosina. La sustitución de inosina por una o más guaninas en una cadena de tres o más bases de guanina consecutivas puede reducir la agregación del oligonucleótido antisentido, facilitando así la purificación.

15 Los oligonucleótidos proporcionados en el presente son sintetizados y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico. Las moléculas de la divulgación también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas al receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para ayudar a la captación, distribución o absorción, o una combinación de las mismas.

20 Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a oligonucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick. Por ejemplo, la secuencia "T-G-A (5'-3')", es complementaria a la secuencia "T-C-A (5-3')". La complementariedad puede ser "parcial", en la que sólo algunas de las bases de los ácidos nucleicos coinciden según las reglas de emparejamiento de bases. O puede haber una complementariedad "completa", "total" o "perfecta" (100%) entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos en la eficiencia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácidos nucleicos. Aunque a menudo se desea una complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más, pero preferiblemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 mal apareamientos con respecto al ARN objetivo. Dicha hibridación puede producirse con una complementariedad "cercana" o "sustancial" del oligómero antisentido con la secuencia objetivo, así como con una complementariedad exacta. En algunas realizaciones, un oligómero puede hibridarse con una secuencia objetivo con una complementariedad de aproximadamente el 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %
25 30 %, 99 % o 100 %. Se incluyen las variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En ciertas realizaciones, las variaciones en la secuencia cerca de los extremos de un oligómero son generalmente preferibles a las variaciones en el interior, y si están presentes están normalmente dentro de aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2, o 1 nucleótidos del 5' terminal, 3' terminal, o ambos terminales.

35 Los términos "TEG", "EG3" o "cola de trietilenglicol" se refieren a las porciones de trietilenglicol conjugadas con el oligómero, por ejemplo, en su extremo 3'- o 5'-. Por ejemplo, en algunas realizaciones, "TEG" incluye, por ejemplo, en donde R³ del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula (I) o (Ic) es de la fórmula:



40 El término "péptido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de aminoácidos enlazados. Los péptidos proporcionados en la presente pueden considerarse péptidos de penetración celular.

45 Los términos "péptido de penetración celular" y "CPP" se utilizan indistintamente y se refieren a péptidos catiónicos de penetración celular, también llamados péptidos de transporte, péptidos portadores o dominios de transducción de péptidos. Los péptidos, proporcionados en la presente, 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. En varias realizaciones, una realización de CPP de la divulgación puede incluir un péptido rico en arginina como se describe más adelante.

50 El término "tratamiento" se refiere a la aplicación de uno o más procedimientos específicos utilizados para la mejora de una enfermedad. En ciertas realizaciones, el procedimiento específico es la administración de uno o más agentes farmacéuticos. El "tratamiento" de un individuo (por ejemplo, un mamífero, como un ser humano) o una célula es cualquier tipo de intervención utilizada en un intento de alterar el curso natural del individuo o la célula. El tratamiento incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica, y puede realizarse de forma profiláctica o tras el inicio de un evento patológico o el contacto con un agente etiológico. En ciertas realizaciones, el tratamiento incluye, pero no se limita a, la administración de una composición farmacéutica, y puede realizarse tras el inicio de un evento patológico o el contacto con un agente etiológico. El tratamiento incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección, y puede incluir, por ejemplo, cambios mínimos o mejoras en uno o más marcadores

medibles de la enfermedad o afección tratada. También se incluyen los tratamientos “profilácticos”, que pueden estar dirigidos a reducir la tasa de progresión de la enfermedad o afección que se está tratando, a retrasar la aparición de dicha enfermedad o afección, o a reducir la gravedad de su aparición. Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de compuesto terapéutico, como un oligómero en antisentido, administrado a un sujeto mamífero, ya sea como dosis única o como parte de una serie de dosis, que es eficaz para producir un efecto terapéutico deseado.

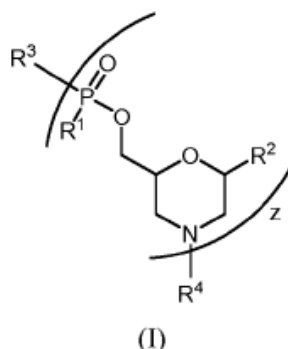
El término “mejora” significa una disminución de la gravedad de al menos un indicador de una afección o enfermedad. En ciertas realizaciones, la mejora incluye un retraso o ralentización de la progresión de uno o más indicadores de una afección o enfermedad. La gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas conocidas por los expertos en la técnica.

Tal como se utiliza en la presente, “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a los derivados de los oligonucleótidos divulgados donde el oligonucleótido original se modifica convirtiendo una porción de ácido o base existente en su forma de sal. Las listas de sales adecuadas se encuentran en Remington’s Pharmaceutical Sciences, 17° ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 y Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977).

Conjugados de péptido oligómero

En la presente se presentan oligómeros (por ejemplo, compuestos antisentido) químicamente enlazados a una o más porciones, como un péptido de penetración celular, que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligómero. Los oligómeros pueden estar unidos químicamente a uno o más porciones de heteroalquilo (por ejemplo, polietilenglicol) que mejoran aún más la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligómero. En una realización ejemplar, un polipéptido rico en arginina se acopla covalentemente en su residuo N-terminal o C-terminal a cualquier extremo del compuesto en antisentido, o internamente al compuesto antisentido.

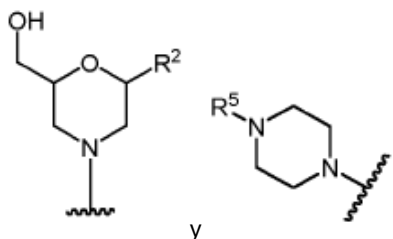
Así, en un aspecto, el conjugado de polímero de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

en donde:

R^3 se selecciona de OH, $-N(H)CH_2C(O)NH_2$, $-N(\text{alquilo de } C_{1-6})CH_2C(O)NH_2$



R^5 es $-C(O)(O\text{-alquilo})_xOH$, en donde x es 3-10 y cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C_{2-6} , o R^5 se selecciona del grupo que consiste en $-C(O)\text{alquilo de } C_{1-6}$, tritilo, monometoxitilo, $-(\text{alquilo de } C_{1-6})-R^6$, $-(\text{heteroalquilo de } C_{1-6})-R^6$, arilo- R^6 , heteroarilo- R^6 , $-C(O)O-(\text{alquilo de } C_{1-6})-R^6$, $-C(O)O\text{-arilo-}R^6$, $-C(O)O\text{-heteroarilo-}R^6$, y R^{12} ;

R^6 se selecciona de OH, SH y NH_2 , o R^6 es O, S o NH, enlazado covalentemente a un soporte sólido;

R^1 es, independientemente en cada caso, OH, $-NR^7R^{12}$, o $-NR^7R^8$;

cada R^7 y R^8 son, independientemente en cada caso, H o alquilo de C_{1-6} ;

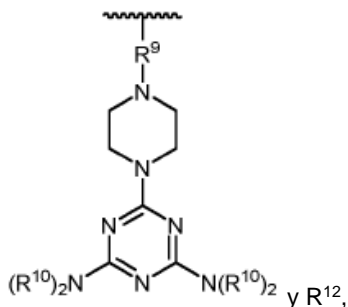
R^2 es, independientemente en cada caso, seleccionado del grupo que consiste en H, una nucleobase y una nucleobase

funcionalizada con un grupo químico protector, en donde la nucleobase, independientemente en cada caso, comprende un anillo heterocíclico de C₃₋₆ seleccionado entre piridina, pirimidina, triazinano, purina y deazapurina;

z es 8-40;

5

R⁴ se selecciona de H, alquilo de C₁₋₆, -C(O)alquilo de C₁₋₆, benzoilo, estearoilo, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo,



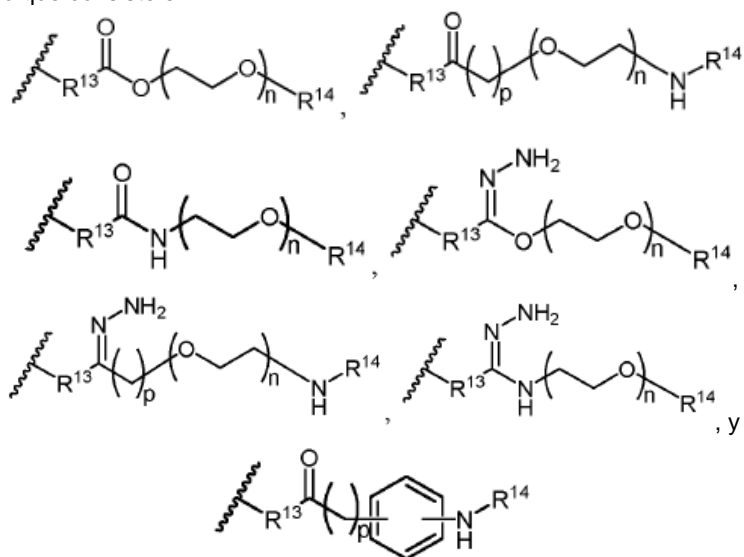
10 R⁹ es -C(O)(CH₂)₆C(O)- o -C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)-;

R¹⁰ es -(CH₂)₂OC(O)N((CH₂)₆N(H)C(=NH)NH₂)₂;

R¹¹ se selecciona de OH y -NR⁷R⁸;

15

R¹² se selecciona del grupo que consiste en:



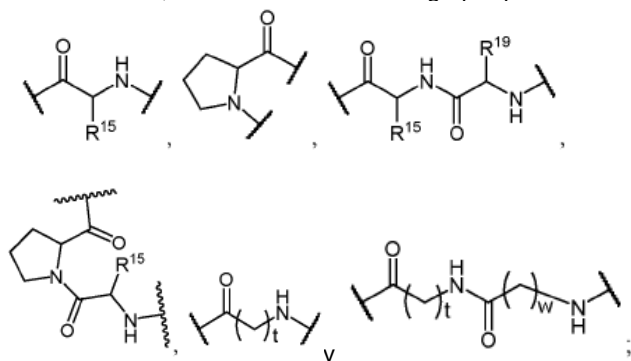
20

n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

p es 2, 3, 4, o 5;

25

R¹³ es un enlace, o R¹³ se selecciona del grupo que consiste en:



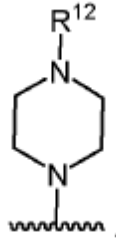
R¹⁸ se selecciona del grupo que consiste en:

H, -C(O)alquilo de C₁₋₆, benzoilo y estearoilo;

5 r es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; y

y y u son, independientemente en cada caso, 2, 3, 4 o 5;

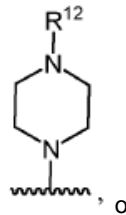
siempre que se dé una de las siguientes condiciones: 1) R¹ es NR⁷R¹²; o 2) R⁴ es R¹²; o 3) R³ es;



10

En una realización del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I, R⁴ se selecciona de H, alquilo de C₁₋₆, -C(O)alquilo de C₁₋₆, benzoilo, estearoilo, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo, y R¹².

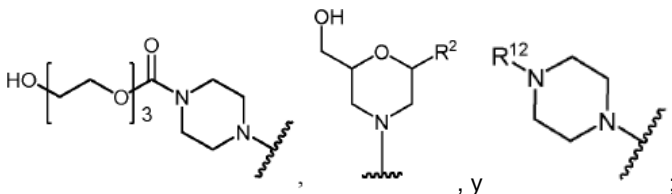
15 En otra realización, R³ es



R⁴ es R¹².

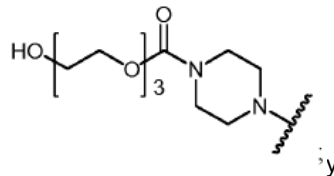
20

En otra realización, R³ se selecciona de entre -OH, -N(alquilo de C₁₋₆)CH₂C(O)NH₂,



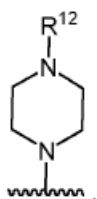
En aún otra realización, R⁴ se selecciona de H, -C(O)CH₃, tritilo, 4-metoxitritilo, benzoilo, estearoilo y R¹².

25 En otra realización, R³ se selecciona de entre -OH, -N(alquilo de C₁₋₆)CH₂C(O)NH₂, y



R⁴ es R¹².

En otra realización, R³ es

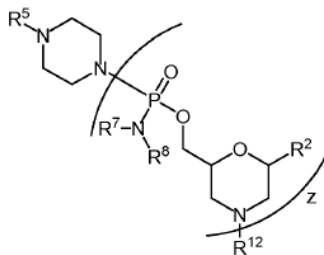


30

En aún otra realización, R⁴ se selecciona de H, -C(O)CH₃, tritilo, 4-metoxitritilo, benzoilo y estearoilo.

En otra realización, R⁴ se selecciona de H y -C(O)CH₃.

5 En otra realización, el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ia:



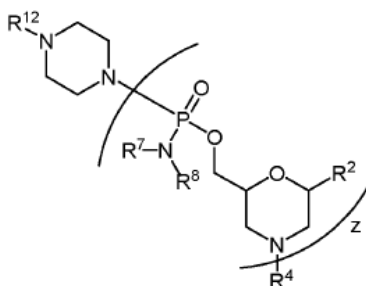
(Ia),

en donde R⁵ es -C(O)(O-alquilo)_xOH, donde x es 3-10 y cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C₂₋₆, o R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C(O)alquilo de C₁₋₆, tritilo y monometoxitritilo.

10 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de Fórmula I o Fórmula Ia, R⁵ es -C(O)(O-alquilo)_xOH, en donde cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C₂₋₆.

En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de Fórmula I o Fórmula Ia, R⁵ es -C(O)(O-CH₂CH₂)₃OH.

15 En aún otra realización, el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ib:



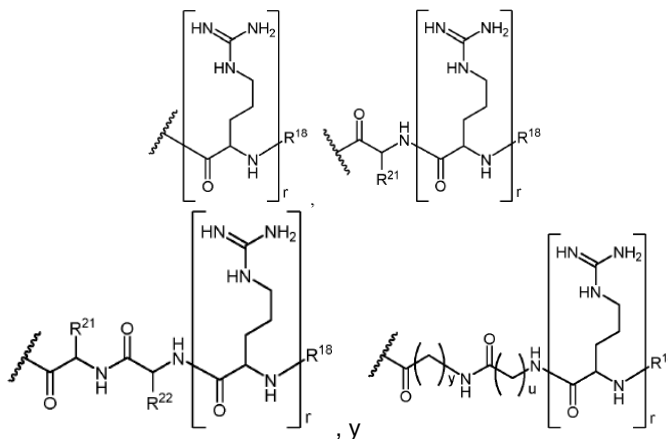
(Ib),

en donde R⁴ se selecciona de H, alquilo de C₁₋₆, -C(O)alquilo de C₁₋₆, benzoilo, estearoilo, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo.

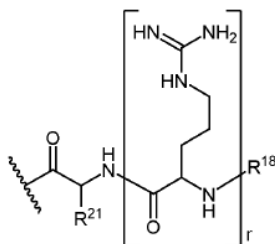
20 En una realización del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I, R⁴ se selecciona de H, alquilo de C₁₋₆, -C(O)CH₃, benzoilo y estearoilo.

En una realización del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ib, R⁴ se selecciona de H y -C(O)CH₃.

25 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁶ se selecciona del grupo que consiste en:

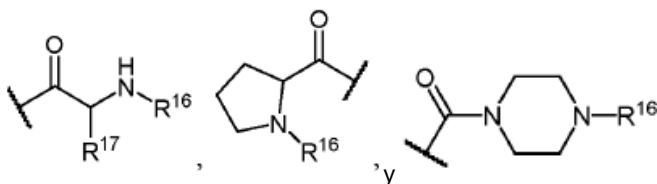


En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁶ es



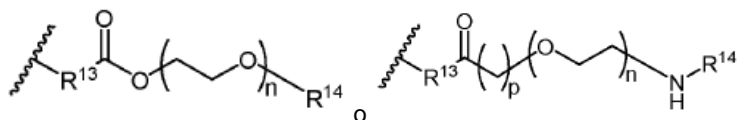
5

En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹² se selecciona del grupo que consiste en:

10



En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, r es 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

15

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, r es 5, 6 o 7.

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, r es 6.

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹³ es un enlace.

20

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, z es 8-25.

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, z es 15-25.

25

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, z es 10-20.

En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, cada R¹ es independientemente NR⁷R⁸, en donde cada R⁷ y R⁸ son, independientemente en cada caso, alquilo de C₁₋₃.

30

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, cada R¹ es N(CH₃)₂.

En otra realización de los conjugados péptido-oligómero de la divulgación, cada R² es una nucleobase, en donde la nucleobase, independientemente en cada caso, comprende un anillo heterocíclico de C₄₋₆ seleccionado entre piridina, pirimidina, triazinano, purina y deaza-purina.

35

En otra realización de los conjugados péptido-oligómero de la divulgación, cada R² es una nucleobase, en donde la nucleobase, independientemente en cada caso, comprende un anillo heterocíclico de C₄₋₆ seleccionado entre piridina, purina y deaza-purina.

40

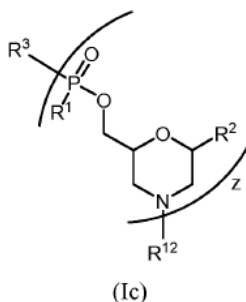
En otra realización de los conjugados péptido-oligómero de la divulgación, cada R² es una nucleobase, en donde la nucleobase, independientemente en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en adenina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, guanina, 7-deaza-guanina, hipoxantina, citosina, 5-metil-citosina, timina y uracilo.

45

En otra realización de los conjugados péptido-oligómero de la divulgación, cada R² es una nucleobase, en donde la nucleobase, independientemente en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, 5-metil-citosina, timina, uracilo e hipoxantina.

En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁵ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, -CH(CH₃)₂, y -(CH₂)₃NH-C(=NH)-NH₂.

- En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, -CH(CH₃)₂, y -(CH₂)₃NH-C(=NH)-NH₂.
- 5 En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R²⁰ se selecciona del grupo que consiste en H, CH₃, -CH(CH₃)₂, y -(CH₂)₃NH-C(=NH)-NH₂.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁷ es H o CH₃.
- 10 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁷ es H.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R²¹ es H o CH₃.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R²¹ es H.
- 15 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R²² es H o CH₃.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R²² es H.
- 20 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R⁶ se selecciona de OH, SH y NH₂.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R⁷ y R⁸ son, independientemente en cada caso, H o CH₃.
- 25 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, cada R⁷ y R⁸ son CH₃.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, n es 2, 3, 4, 5, 6 o 7.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, p es 3 o 4.
- 30 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, t es 3 o 4.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, w es 3 o 4.
- 35 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, v es 3 o 4.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, x es 3 o 4.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, y es 3 o 4.
- 40 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, u es 3 o 4.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, q es 3 o 4.
- 45 En una realización del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I, R¹⁸ se selecciona de H, -C(O)alquilo de C₁-C₃, benzoilo y estearoilo.
- En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁸ es H o C(O)alquilo de C₁-C₃.
- 50 En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁸ es H o -C(O)CH₃.
- En otra realización, el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ic:

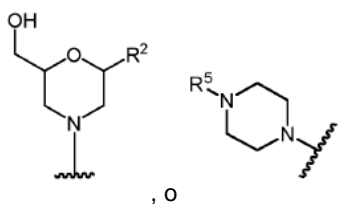


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

55

en donde:

R³ es OH,



5

R⁵ es -C(O)(O-alkilo)_xOH, en donde x es 3-10 y cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C₂₋₆, o R⁵ es -C(O)alquilo de C₁₋₆;

R¹ es, independientemente en cada caso, OH o -NR⁷R⁸;

10

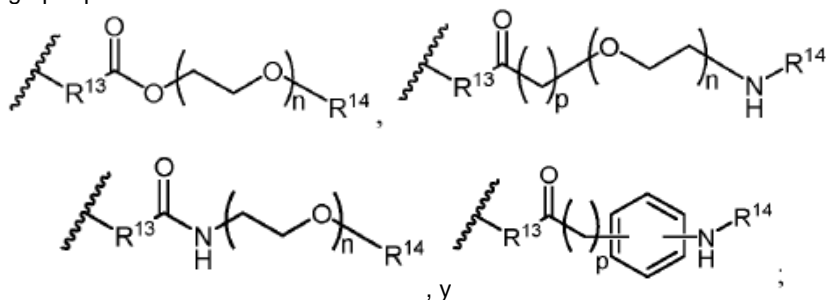
cada R⁷ y R⁸ son, independientemente en cada caso, alquilo de C₁₋₆;

R² es independientemente en cada caso, seleccionado del grupo que consiste en H, adenina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, guanina, 7-deaza-guanina, hipoxantina, citosina, 5-metil-citosina, timina y uracilo;

15

z es 8-40;

R¹² se selecciona del grupo que consiste en:



20

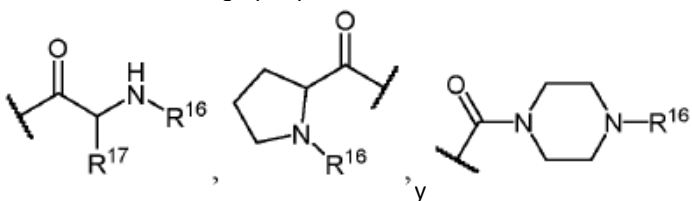
N es 1,2,3,4,5,6,7,8,9, o 10;

p es 2, 3, 4, o 5;

25

R¹³ es un enlace;

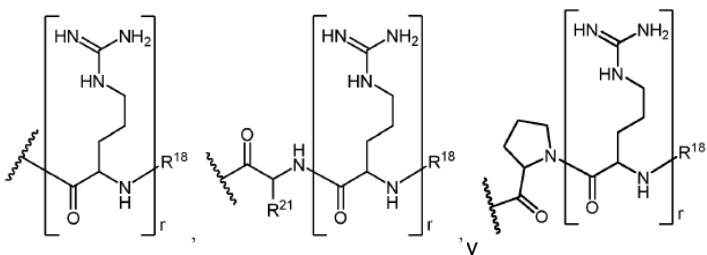
R¹⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



30

R¹⁷ es H o -alquilo de C₁₋₄;

R¹⁶ se selecciona del grupo que consiste en:



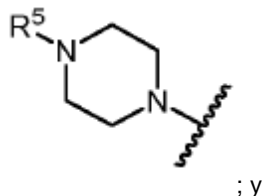
35

R²¹ es H o -alquilo de C₁₋₄;

R¹⁸ es de H o C(O) alquilo de C₁₋₆; y

r es 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

5 En una realización del conjugado de péptido-oligómero de la Fórmula Ic, R³ es

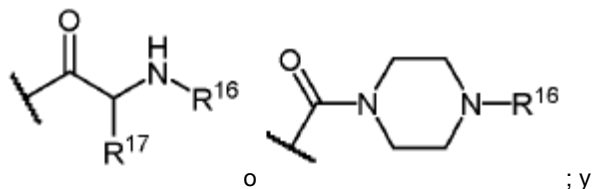


10 R⁵ es -C(O)(O-alquilo de C₂₋₆)₃OH o -C(O)alquilo de C₁₋₆.

En otra realización del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ic, R¹ es, independientemente en cada caso, OH o -N(alquilo de C₁₋₆)₂.

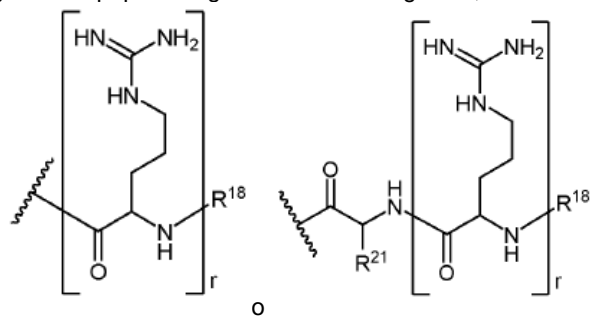
15 En otra realización del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ic, R², independientemente en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, 5-metil-citosina, timina, uracilo e hipoxantina.

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁴ es



20 R¹⁷ es H,

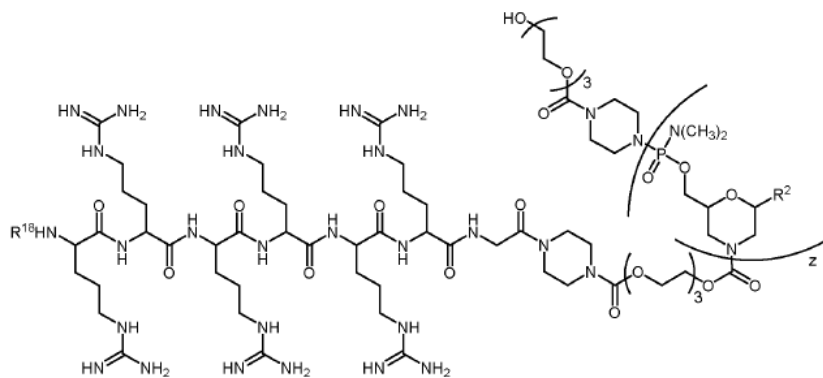
En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁶ es

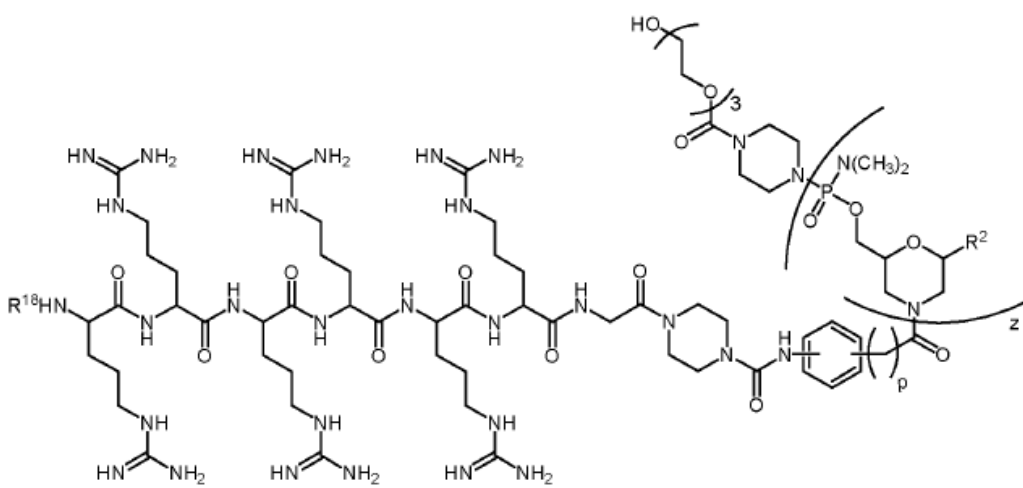
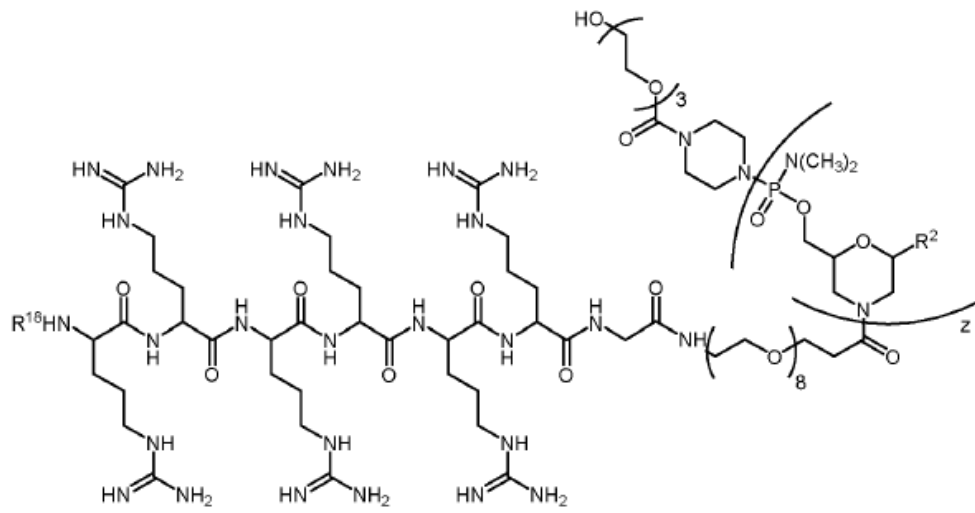
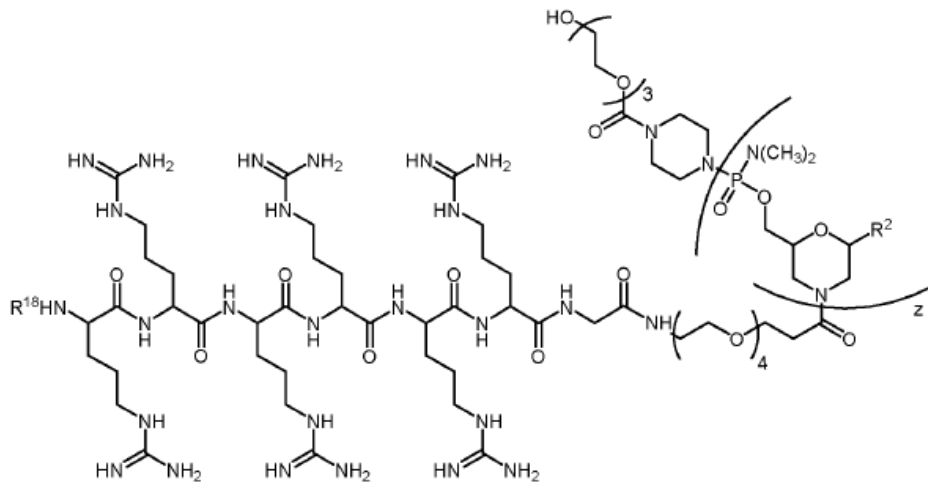


En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, r es 5, 6 o 7.

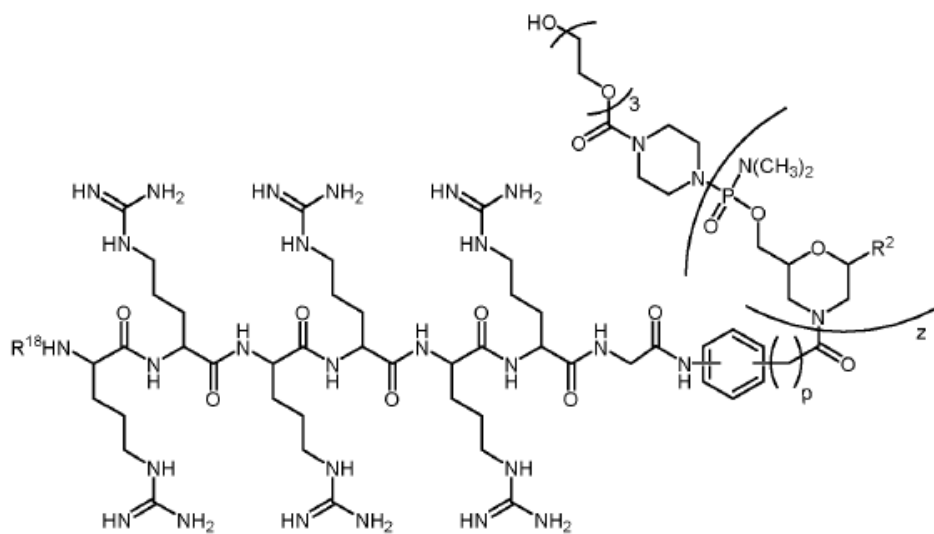
25

En otra realización del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ic, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, el conjugado de péptido-oligómero se selecciona del grupo que consiste en:





y

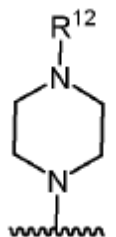


en donde R¹⁸ se selecciona de H y -C(O)CH₃.

En una realización del conjugado de péptido-oligómero de la Fórmula Ic, R¹⁸ es H.

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, R¹⁸ es -C(O)CH₃.

En una realización alternativa del conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I, al menos una de las siguientes condiciones está presente: 1) R¹ es NR⁷R¹²; o 2) R⁴ es R¹²; o 3) R³ es



En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, el oligonucleótido comprende una secuencia de direccionamiento que tiene complementariedad de secuencia con un objetivo de ARN.

En una realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, el objetivo de ARN es un objetivo de ARN celular.

En otra realización de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, la secuencia de direccionamiento tiene suficiente complementariedad de secuencia para unirse al objetivo de ARN.

En otra realización de los conjugados péptido-oligómero de la divulgación, la secuencia de direccionamiento tiene una complementariedad de secuencia perfecta con el objetivo de ARN.

En algunas realizaciones, los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación están sin solvatar. En otras realizaciones, uno o más de los conjugados péptido-oligómero están en forma solvatada. Como se sabe en la técnica, el solvato puede ser cualquier disolvente farmacéuticamente aceptable, como agua, etanol y similares.

Aunque los conjugados de péptido-oligómero de Fórmula I, Fórmula Ia, Fórmula Ib y Fórmula Ic se representan en sus formas neutras, en algunas realizaciones, estos conjugados de péptido-oligonucleótido se utilizan en una forma de sal farmacéuticamente aceptable.

Oligómeros

Las propiedades importantes de las subunidades a base de morfolino incluyen: 1) la capacidad de unirse en forma oligomérica mediante enlaces estables, no cargados o cargados positivamente de la cadena principal; 2) la capacidad de soportar una base nucleotídica (por ejemplo, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo, 5-metil-citosina e hipoxantina) de manera que el polímero formado pueda hibridarse con un ácido nucleico objetivo de base complementaria, incluido el ARN objetivo, con valores de T_M (temperatura de fusión) superiores a aproximadamente 45 °C en oligómeros relativamente cortos (por ejemplo, 10-15 bases); 3) la capacidad del oligómero de ser transportado activa o pasivamente

a las células de mamíferos; y 4) la capacidad del oligómero y heterodúplex de oligómero:ARN de resistir la degradación de la ARNasa y la RNasa H, respectivamente.

La estabilidad del dúplex formado entre un oligómero y una secuencia objetivo es una función de la T_M de unión y la susceptibilidad del dúplex a la escisión enzimática celular. La T_M de un oligómero con respecto al ARN de secuencia complementaria puede medirse por métodos convencionales, como los descritos por Hames et al., *Nucleic Acid Hybridization*, IRL Press, 1985, pp. 107-108 o como se describe en Miyada C. G. y Wallace R. B., 1987, *Oligomer Hybridization Techniques*, *Methods Enzymol.* Vol. 154 pp. 94-107. En ciertas realizaciones, los oligómeros antisentido pueden tener una T_M de unión, con respecto a un ARN de secuencia complementaria, mayor que la temperatura corporal y, en algunas realizaciones mayor que aproximadamente 45 °C o 50 °C. También se incluyen T_M en el intervalo de 60-80 °C o mayores. Según principios bien conocidos, la T_M de un oligómero, con respecto a un híbrido de ARN de secuencia complementaria, puede aumentarse incrementando la proporción de bases emparejadas C:G en el dúplex, o aumentando la longitud (en pares de bases) del heterodúplex, o ambas cosas. Al mismo tiempo, para optimizar la captación celular, puede ser ventajoso limitar el tamaño del oligómero. Por esta razón, los compuestos de la divulgación incluyen compuestos que muestran una alta T_M (45-50 °C o mayor) con una longitud de 25 bases o menos.

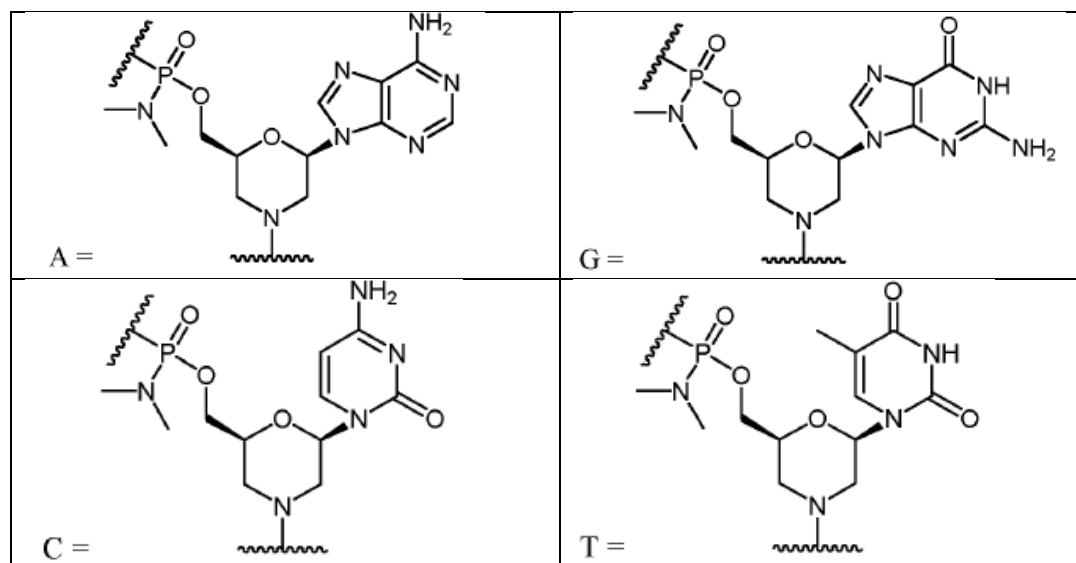
La longitud de un oligómero puede variar siempre que sea capaz de unirse selectivamente a la ubicación prevista dentro de la molécula de pre-ARNm. La longitud de dichas secuencias puede determinarse de acuerdo con los procedimientos de selección descritos en la presente. Generalmente, el oligómero tendrá una longitud de aproximadamente 8 nucleótidos hasta aproximadamente 50 nucleótidos. Por ejemplo, la longitud del oligómero (z) puede ser de 8-40, 8-25, 15-25, 10-20, o aproximadamente 18. Sin embargo, se apreciará que cualquier longitud de nucleótidos dentro de este intervalo puede utilizarse en los métodos descritos en la presente.

En algunas realizaciones, los oligómeros antisentido contienen modificaciones o sustituciones de bases. Por ejemplo, pueden seleccionarse ciertas nucleobases para aumentar la afinidad de unión de los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente. Estas incluyen 5-pirimidinassustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y 0-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina y 2,6-diaminopurina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C, y pueden incorporarse a los oligómeros antisentido descritos en la presente. En una realización, al menos una base de pirimidina del oligómero comprende una base de 5-pirimidina sustituida, en donde la base de pirimidina se selecciona del grupo que consiste en citosina, timina y uracilo. En una realización, la base de 5-pirimidina sustituida es 5-metilcitosina. En otra realización, al menos una base de purina del oligonucleótido comprende una base de purina N-2, N-6 sustituida. En una realización, la base de purina N-2, N-6 sustituida es 2,6-diaminopurina.

Los oligómeros basados en morfolinos (incluidos los oligómeros antisentido) se detallan, por ejemplo, en las patentes estadounidenses núms. 5.698.685; 5.217.866; 5.142.047; 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.521.063; 5.506.337, 8.299.206; y 8.076.476; publicación PCT núms. WO 2009/064471 y WO 2012/043730; y Summerton et al. 1997, *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 7, 187-195.

En la Tabla 1 se presentan varias realizaciones de porciones de nucleótidos como se describen en la presente.

Tabla 1: Varias realizaciones de porciones de nucleótidos.



El sujeto considerado en el presente es típicamente un humano. Sin embargo, el sujeto puede ser cualquier mamífero para el que se desee un tratamiento. Por lo tanto, los usos descritos en la presente pueden aplicarse tanto a los humanos como a los veterinarios.

5 Administración/dosis

La formulación de las composiciones terapéuticas y su posterior administración (dosificación) están dentro de la habilidad de aquellos en la técnica. La dosificación depende de la gravedad y la capacidad de respuesta del estado de la enfermedad que se va a tratar, y el curso del tratamiento puede durar desde varios días hasta varios meses, o hasta que se logre una disminución suficiente del estado de la enfermedad. Los programas de dosificación óptimos pueden calcularse a partir de las mediciones de la acumulación del fármaco en el cuerpo del paciente.

Las personas con conocimientos ordinarios pueden determinar fácilmente las dosis óptimas, las metodologías de dosificación y las tasas de repetición. Las dosis óptimas pueden variar en función de la potencia relativa de los oligómeros individuales, y en general pueden estimarse basándose en la EC₅₀ encontradas como eficaz en modelos animales *in vitro* e *in vivo*. En general, las dosis van de 0,01 µg a 100 g/kg de peso corporal, y pueden administrarse una o más veces al día, semanal, mensual o anualmente, o incluso una vez cada 2 a 20 años. Las personas con conocimientos ordinarios de la técnica pueden estimar fácilmente las tasas de repetición de las dosis basándose en los tiempos de permanencia medidos y en las concentraciones del fármaco en los fluidos o tejidos corporales. Después de un tratamiento exitoso, puede ser deseable que el paciente se someta a una terapia de mantenimiento para prevenir la recurrencia del estado de la enfermedad, donde el oligómero se administra en dosis de mantenimiento, que van desde 0,01 µg a 100 g/kg de peso corporal, una o más veces al día, hasta una vez cada 20 años.

En algunas realizaciones, el conjugado de péptido-oligómero (un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I, Fórmula la, Fórmula lb o Fórmula lc) se administra solo.

En algunas realizaciones, el conjugado de péptido-oligómero se administra en una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad del conjugado de péptido-oligómero (un conjugado de péptido-oligonucleótido de Fórmula I, Fórmula la, Fórmula lb o Fórmula lc) que, cuando se administra a un paciente por sí solo, trata eficazmente una enfermedad muscular, una infección viral o una infección bacteriana. Una cantidad que resulte ser una "cantidad terapéuticamente eficaz" en un caso determinado, para un sujeto concreto, puede no ser eficaz para el 100% de los sujetos tratados de forma similar para la enfermedad o afección considerada, aunque dicha dosis sea considerada una "cantidad terapéuticamente eficaz" por los profesionales expertos. La cantidad del conjugado de péptido-oligómero que corresponde a una cantidad terapéuticamente eficaz depende en gran medida del tipo de enfermedad, el estadio de la misma, la edad del paciente que se está tratando y otros datos.

En diferentes realizaciones, dependiendo del conjugado de péptido-oligómero (un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I, Fórmula la, Fórmula lb o Fórmula lc) y de las cantidades eficaces utilizadas, el conjugado de péptido-oligómero puede modular la expresión de un gen implicado en una enfermedad muscular, una infección viral o una infección bacteriana.

Aunque las cantidades del conjugado de péptido-oligómero (un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I, Fórmula la, Fórmula lb o Fórmula lc) deben dar lugar a un tratamiento eficaz de un trastorno del sistema nervioso central, una enfermedad muscular, una infección viral o una infección bacteriana, las cantidades, preferiblemente, no son excesivamente tóxicas para el paciente (es decir, las cantidades están preferiblemente dentro de los límites de toxicidad establecidos por las directrices médicas). En algunas realizaciones, ya sea para evitar una toxicidad excesiva o para proporcionar un tratamiento más eficaz, o ambas cosas, de un trastorno del sistema nervioso central, una enfermedad muscular, una infección viral o una infección bacteriana, se proporciona una limitación de la dosificación total administrada. Normalmente, las cantidades consideradas en la presente son por día; sin embargo, también se consideran en la presente ciclos de medio día y de dos o tres días.

Pueden utilizarse diferentes regímenes de dosificación para tratar un trastorno del sistema nervioso central, una enfermedad muscular, una infección viral o una infección bacteriana. En algunas realizaciones, una dosis diaria, como cualquiera de las dosis ejemplares descritas anteriormente, se administra una, dos, tres o cuatro veces al día durante tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez días. Dependiendo de la etapa y la gravedad de la enfermedad que se está tratando, se puede emplear un tiempo de tratamiento más corto (por ejemplo, hasta cinco días) junto con una dosis alta, o se puede emplear un tiempo de tratamiento más largo (por ejemplo, diez o más días, o semanas, o un mes, o más) junto con una dosis baja. En algunas realizaciones, se administra una dosis de una o dos veces al día en días alternos.

Los conjugados de péptido-oligómero (conjugados de péptido-oligómero de Fórmula I, Fórmula la, Fórmula lb o Fórmula lc), o sus sales o formas de solvato farmacéuticamente aceptables, en forma pura o en una composición farmacéutica apropiada, pueden administrarse mediante cualquiera de los modos de administración aceptados o agentes conocidos en la técnica. Los conjugados de péptido-oligómero pueden administrarse, por ejemplo, por vía oral, nasal, parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea), tópica, transdérmica, intravaginal, intravesical, intracisternal o rectal. La forma de dosificación puede ser, por ejemplo, una forma de dosificación sólida, semisólida, en polvo liofilizado o líquida, como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, cápsulas de gelatina blanda elástica o dura, polvos, soluciones, suspensiones,

supositorios, aerosoles o similares, por ejemplo, en formas de dosificación unitarias adecuadas para la administración sencilla de dosis precisas. Una vía de administración particular es la oral, en particular una en la que se puede ajustar un régimen de dosificación diaria conveniente según el grado de gravedad de la enfermedad a tratar.

5 Los agentes auxiliares y adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, agentes conservantes, humectantes, suspensores, edulcorantes, aromatizantes, perfumantes, emulsionantes y dispensadores. La prevención de la acción de los microorganismos se consigue generalmente con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, como parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico y similares. También pueden incluirse agentes isotónicos, como azúcares, cloruro de sodio y similares. La absorción prolongada de una forma farmacéutica inyectable puede producirse mediante el uso de
10 agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina. Los agentes auxiliares también pueden incluir agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes amortiguadores del pH y antioxidantes, como, por ejemplo, ácido cítrico, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, hidroxitolueno butilado y similares.

15 Las formas farmacéuticas sólidas pueden prepararse con recubrimientos y cubiertas, como los recubrimientos entéricos y otros conocidos en la técnica. Pueden contener agentes pacificadores y pueden tener una composición tal que liberen los conjugados de péptido-oligómero activos en una parte determinada del tracto intestinal de forma retardada. Ejemplos de composiciones embebidas que pueden utilizarse son sustancias poliméricas y ceras. Los conjugados de péptido-oligómero activos también pueden estar en forma microencapsulada, si procede, con uno o más de los excipientes antes mencionados.

20 Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Tales formas de dosificación se preparan, por ejemplo, por disolución, dispersión, etcétera, los conjugados de péptido-oligómero descritos en la presente, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y adyuvantes farmacéuticos opcionales en un portador, como, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa acuosa, glicerol, etanol y similares; agentes solubilizantes y emulsionantes, como, por ejemplo, alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida; aceites, en particular, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de germen de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán; o mezclas de estas sustancias, y similares, para formar así una solución o suspensión.

30 En general, dependiendo del modo de administración previsto, las composiciones farmacéuticamente aceptables contendrán aproximadamente entre el 1 % y el 99 % en peso de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, y entre el 99 % y el 1 % en peso de un excipiente farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, la composición tendrá entre aproximadamente el 5 % y aproximadamente el 75 % en peso de un conjugado de péptido-oligómero de la divulgación, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, siendo el resto excipientes farmacéuticos adecuados.

35 Los métodos concretos de preparación de tales formas de dosificación son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica. Por ejemplo, se hace referencia a Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^o Ed. (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990).

Kits

45 En otras realizaciones, se proporcionan kits. Los kits de acuerdo con la divulgación incluyen paquetes que comprenden conjugados de péptido-oligómero, o composiciones de la divulgación. En algunas realizaciones, los kits comprenden un conjugado de péptido-oligómero según la Fórmula I, Fórmula Ia, Fórmula Ib, o Fórmula Ic, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

50 La frase "envase" significa cualquier recipiente que contenga conjugados de péptido-oligómero o composiciones presentadas en la presente. En algunas realizaciones, el envase puede ser una caja o un embalaje. Los materiales de envasado que se utilizan para envasar productos farmacéuticos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de materiales de envasado de productos farmacéuticos incluyen, pero no se limitan a, frascos, tubos, inhaladores, bombas, bolsas, viales, contenedores, jeringas, botellas y cualquier material de envasado adecuado para una formulación seleccionada y un modo de administración y tratamiento previsto.

55 El kit también puede contener elementos que no están contenidos en el envase, sino que están adheridos al exterior del mismo, por ejemplo, pipetas.

60 Los kits pueden contener además instrucciones para la administración de los conjugados de péptido-oligómero o las composiciones de la divulgación a un paciente. Los kits también pueden comprender instrucciones para los usos aprobados de los conjugados de péptido-oligómero en la presente por las agencias reguladoras, como la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de América. Los kits también pueden contener el etiquetado o los prospectos del producto para los conjugados de péptido-oligómero. El envase o los prospectos del producto, o ambos, pueden ser aprobados por las agencias reguladoras. Los kits pueden incluir conjugados de péptido-oligómero en fase
65 sólida o en fase líquida (como los amortiguadores suministrados) en un envase. Los kits también pueden incluir amortiguadores para preparar soluciones para llevar a cabo los métodos, y pipetas para transferir líquidos de un recipiente

a otro.

Ejemplos

5 Los ejemplos que se exponen a continuación tienen por objeto ilustrar y describir ciertas realizaciones específicas de la divulgación. Sin embargo, el alcance de las reivindicaciones no debe estar limitado en modo alguno por los ejemplos expuestos en la presente. Diversos cambios y modificaciones de las realizaciones divulgadas serán evidentes para los expertos en la técnica y tales cambios y modificaciones, incluyendo, sin limitación, los relativos a las estructuras químicas, sustituyentes, derivados, formulaciones o métodos de la divulgación, pueden realizarse sin apartarse del espíritu de la divulgación y del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Las definiciones de las variables en las estructuras de los esquemas expuestos en la presente son acordes con las de las posiciones correspondientes en las fórmulas presentadas en la presente.

Ejemplo 1: Síntesis del PPMO-5 y PPMO-1

15 Como se muestra en la figura 1, a una mezcla del PMO (PPMO-3, 1 eq.) descrita en la siguiente tabla 1a, al ácido Fmoc-amino-PEGm-propiónico (5 eq.), HATU (5 eq.) en DMSO se le añadió DIPEA (10 eq.) a temperatura ambiente. Tras agitar durante 4 horas, se añadió un exceso de metilpiperidina-4 y se continuó agitando a temperatura ambiente durante toda la noche. El producto bruto se diluyó con agua desionizada y se purificó por SPE (Amberchrom CG300M). El producto se obtuvo por liofilización como un polvo blanco y su estructura se confirmó por LC/MS.

25 A una mezcla del producto anterior, Ac-R₆-Gly (4 eq.; SEQ ID NO:1), y HATU (4 eq.) en DMSO se añadió DIPEA (10 eq.) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. La mezcla de reacción se diluyó con agua desionizada y se purificó mediante un sistema de cromatografía ISCO (columna SCX, fuente 30s, fase móvil (pH = 7): Disolvente A: 20 mM NaHPO₄/25 % ACN (pH = 7); Disolvente B: Clorhidrato de guanidina 1,5 M, 20 mM NaH₂PO₄/25 % ACN, luego desalado por SPE (Amberchrom CG300M). El producto se obtuvo por liofilización como un polvo blanco y su estructura se confirmó por LC/MS.

Tabla 1a

Nombre del compuesto	Secuencia de nucleobase	Unión 5'	Unión 3'
PPMO-3	5'-GCT ATT ACC TTA ACC CAG T-3' (SEQIDNO:3)	TEG	H

30

Ejemplo 2: Síntesis del PPMO-4

35 Como se muestra en la figura 2, a una mezcla del PMO (PPMO-3, 1 eq.) y el enlazador "P3P" (2,5 eq.) en DMSO se añadió N-etil morfolina (2,5 eq.) a temperatura ambiente. Tras agitar durante 2 horas, se añadió morfolina (3 eq.) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió un exceso de solución de CYTFA 50 mM y se agitó durante 1 h, después se basificó la solución añadiendo una solución de Na₂HPO₄ 1 M. El producto bruto se diluyó con agua desionizada y se purificó por SPE (Amberchrom CG300M). El producto se obtuvo por liofilización como un polvo blanco y su estructura se confirmó por LC/MS.

40 A una mezcla del producto anterior, Ac-R₆-Gly (4 eq.; SEQ ID NO:1), y HATU (4 eq.) en DMSO se añadió DIPEA (10 eq.) a temperatura ambiente y se agitó durante 4 horas. El producto bruto se diluyó con agua desionizada y se purificó mediante un sistema de cromatografía ISCO (columna SCX, fuente 30s, fase móvil (pH = 7): Disolvente A: 20 mM NaHPO₄/25 % ACN (pH = 7); Disolvente B: Clorhidrato de guanidina 1,5 M, 20 mM NaH₂PO₄/25 % ACN, luego desalado por SPE (Amberchrom CG300M). El producto se obtuvo por liofilización como un polvo blanco y su estructura se confirmó por LC/MS.

45

Ejemplo 3: Respuesta a la dosis para la eficacia de los compuestos modificados por el enlazador en ratones MDX

50 El objetivo de este estudio fue comparar la eficacia de los conjugados de péptido-oligómero de la divulgación en un estudio de respuesta a la dosis en ratones. El espacio entre el péptido y el PMO modula la eficacia. En consecuencia, se utilizaron longitudes de PEG de 3, 4 y 8 para aumentar sistemáticamente el espaciado entre Ac-R₆-Gly (SEQ ID NO:1) y el PMO. Además, se utilizó una versión de todos los aminoácidos D de Ac-R₆-Gly (SEQ ID NO:1) y Ac-R₆-Apa (SEQ ID NO:4) (ácido 4-aminofenil acético; enlazador aromático, hidrofóbico) (tabla 2).

55 El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la siguiente normativa de Sanidad Animal: Bienestar Animal del USDA, acto 9 CFR, partes 1 - 3. Registro federal 39129, 22 de julio de 1993. El cuidado de los animales se realizó de acuerdo con el protocolo del estudio y se adhirió a las regulaciones descritas en la Ley de Bienestar Animal del USDA (9 CFR, partes 1, 2 y 3) y a las condiciones especificadas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Publicación ILAR 1996, National Academy Press).

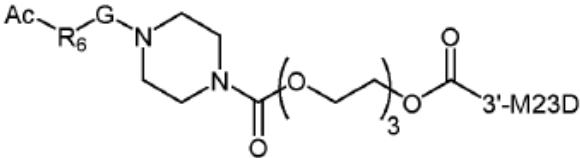
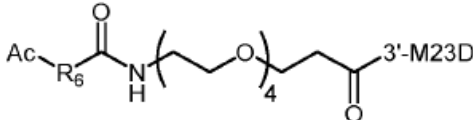
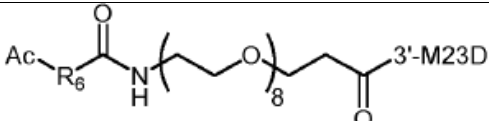
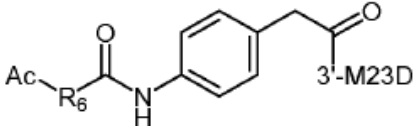
60

Materiales de prueba

Los conjugados de péptido-oligómero seleccionados que se probaron se enlistan en la tabla 2 (los conjugados de péptido-oligómero se formularon en solución salina y se almacenaron a 5 °C).

5

Tabla 2.

Conjugado de péptido-oligómero	Estructura del conjugado de péptido-oligómero
PPMO-4	 <p>Ac-R₆-G-PIP-PEG3 (SEQ ID NO:5)</p>
PPMO-1	 <p>Ac-R₆-G-PEG4 (SEQ ID NO:6)</p>
PPMO-5	 <p>Ac-R₆-G-PEG8 (SEQ ID NO:7)</p>
PPMO-6	 <p>Ac-R₆-Apa (SEQ ID NO:4)</p>
PPMO-7	Ac-dR ₆ -G (todos los amino aminoácidos D R) (SEQ ID NO:8)

*G = Gli, Ac = acetil, R = Arg, M23D = 5'-GCT ATT ACC TTA ACC CAG-3' (SEQ ID NO:2)

Sistema de prueba

10

Los animales utilizados para el estudio se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.

Especie:	Ratón
Cepa/subcepa/fuente:	mdx (C57Bl/10ScSn-Dmd ^{mdx} /J; Jackson Laboratories (#001801))
Edad al llegar:	6-9 semanas de edad
Peso al llegar:	18-22 gramos
Número y sexo:	130 hembras incluidas las extras
Identificación:	Etiqueta en la oreja y tarjeta de jaula codificada por colores

15

Tras la recepción, los animales fueron desembalados y colocados en jaulas. Se realizó una inspección visual de la salud de cada animal que incluyó la evaluación del pelaje, las extremidades y los orificios. Se examinó a cada animal para detectar cualquier signo anormal en la postura o el movimiento. Los ratones se aclimataron durante un mínimo de ocho o nueve días (cohortes 1 y 2, respectivamente) antes de iniciar los procedimientos experimentales.

20

Los animales se alojaron hasta 5 por jaula en jaulas microaisladoras de policarbonato transparente con lecho de contacto

irradiado certificado. Las jaulas se ajustaban a las normas establecidas en la Ley de Bienestar Animal (con todas sus enmiendas) y en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, National Academy Press, Washington, D.C., 1996. Se suministró *ad libitum* una dieta de peletizados ovalados certificada para roedores de laboratorio Pico (PMI Feeds Inc., Richmond, Indiana, EE. UU.). Los animales dispusieron de agua desionizada *ad libitum* durante todo el periodo de estudio. Como enriquecimiento se les proporcionaron iglúes y/o túneles desinfectados y con lechos de Enrich-o'Cobs. No se conocía ningún contaminante en el pienso, el agua, los materiales de enriquecimiento o el lecho que pudiera interferir en este estudio. Los controles ambientales se establecieron para mantener temperaturas de 18 °C a 26 °C (64 °F a 79 °F) con una humedad relativa de 30 % a 70 %. Estos parámetros se registraron al menos una vez al día. Se mantuvo un ciclo de luz:oscuridad de 12:12 horas.

Procedimientos experimentales

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos de tratamiento según el peso de las jaulas, como se especifica en la tabla 4.

Tabla 4. Grupos de tratamiento

Grupo n=5	Conjugado de péptido-oligómero	Dosis por inyección (mg/kg)	Régimen	Vía de administración
1	PPMO-4	5	Inyección única	i.v. por la cola de 200 µL
2		10		
3		20		
4		40		
5		80		
6	PPMO-1	5		
7		10		
8		20		
9		40		
10		80		
11	PPMO-5	5		
12		10		
13		20		
14		40		
15		80		
16	PPMO-6	5		
17		10		
18		20		
19		40		
20		80		
21	PPMO-7	5		
22		10		
23		20		
24		40		
25		80		

El día de la dosificación en el estudio se designó como día de estudio 1. Cada conjugado de péptido-oligómero fue agitado por vórtex durante aproximadamente 10 segundos antes de la dosificación, y administrado por la vena de la cola como un bolo de empuje lento (~5 segundos; 200 µL). La dosificación se realizó durante dos días. Todos los animales que recibieron el mismo conjugado de péptido-oligómero fueron dosificados el mismo día. Los animales asignados a un grupo de tratamiento que no pudieron ser dosificados, tuvieron una inyección fallida o murieron inmediatamente después de la dosis fueron sustituidos por un ratón de reserva. A los animales restantes se les practicó la necropsia y se recogieron los tejidos como se especifica a continuación.

Los animales se observaron una vez al día para comprobar su moribundidad y mortalidad. Cualquier animal que mostrara

signos de angustia, especialmente si la muerte parecía inminente, fue practicada la eutanasia de acuerdo con los procedimientos operativos estándar de Numira Biosciences. Se registraron los pesos corporales el día después de la llegada, el día de la dosificación y el día de la necropsia. Se realizaron y registraron observaciones clínicas detalladas a los 0 minutos, 15 minutos y 2 horas después de la dosis para evaluar la tolerabilidad de las inyecciones.

5

Los animales con pocas probabilidades de sobrevivir hasta la siguiente observación programada fueron pesados y se les practicó la eutanasia. Los animales encontrados muertos se pesaron y se estimó la hora de la muerte con la mayor precisión posible. No se recogieron muestras de sangre ni de tejido.

10

El día 8 (7 días después de la dosis), a todos los animales, incluidos los no tratados o los de reserva, se les practicó la eutanasia de forma humanitaria con dióxido de carbono. La eutanasia se llevó a cabo de acuerdo con las directrices de la Asociación Médica Veterinaria Americana (AVMA, por sus siglas en inglés) sobre la eutanasia, de junio de 2007.

15

La necropsia macroscópica parcial incluyó el examen y la documentación de los hallazgos. Se evaluaron todas las superficies externas y los orificios. Todas las anomalías observadas durante la recogida de los tejidos enumerados a continuación se describieron completamente y se registraron. No se tomaron tejidos adicionales.

20

Los tejidos se recogieron en los 15 minutos o menos posteriores a la eutanasia. Todos los instrumentos y herramientas utilizados se cambiaron entre los grupos de tratamiento. Todos los tejidos se congelaron rápidamente y se almacenaron a una temperatura inferior a -70 °C lo antes posible después de su recogida. Se recogieron los siguientes tejidos: hígado, riñones, corazón, cuádriceps y diafragma.

Resultados – Salud del animal y peso corporal

25

El animal # 2407 estaba bajo de peso y enfermo a su llegada. No fue puesto en estudio y se le practicó la eutanasia de forma humanitaria. Los animales del TG (grupo de tratamiento) 4 (PPMO-4 a 40 mg/kg), TG 5 (PPMO-4 a 80 mg/kg) y TG 20 (PPMO-6 a 80 mg/kg) se recuperaron lentamente en la observación de 15 minutos, pero se recuperaron en la observación de 2 horas. El animal 2356, TG 14, (PPMO-5 a 40 mg/kg) fue encontrado muerto al día siguiente de la dosificación. En el momento de la necropsia, se observó que el animal 2406, TG 1 (PPMO-4 a 5mg/kg) tenía el ojo derecho cerrado y exudaba una sustancia blanca. También en el momento de la necropsia, se observó que el animal 2422, TG 18 (PPMO-6 a 20 mg/kg) tenía una pequeña cantidad de líquido presente en el riñón izquierdo. Los pesos corporales de los animales a lo largo del estudio se presentan en la Tabla 5.

30

Tabla 5. Peso corporal individual (g)

35

Grupo de tratamiento	Animal #	Llegada	Predosis	Preneecropsia
1 (PPMO-4; 5 mg/kg)	2406	18,58	20,72	22,61
	2408	16,92	17,75	19,15
	2409	16,61	18,49	19,6
	2410	18,96	20,61	21,53
	2336	19,6	20,26	21,45
2 (PPMO-4; 10 mg/kg)	2426	16,1	18,7	19,41
	2427	19,05	20,74	21,91
	2428	16,91	18,43	18,98
	2429	18,03	19,59	20,43
	2430	17,09	19,96	20,49
3 (PPMO-4; 20 mg/kg)	2396	16,51	19,41	20,09
	2397	20,65	20,72	21,25
	2398	18,96	21,98	22,62
	2399	17,29	19,79	20,71
	2400	15,39	16,73	17,08
4 (PPMO-4; 40 mg/kg)	2391	18,51	19,95	20,59
	2392	15,27	17,51	18,25
	2393	18,55	21,06	22,63
	2394	18,34	20,52	21,35

ES 2 901 772 T3

Grupo de tratamiento	Animal #	Llegada	Predosis	Prenecropsia
	2395	18,18	20,98	21,22
5 (PPMO-4; 80 mg/kg)	2411	20,37	21,88	23,86
	2412	15,27	16,88	17,9
	2413	18,03	20,42	21,36
	2414	16,73	19,86	21,1
	2415	18,56	20,38	20,69
6 (PPMO-1; 5 mg/kg)	2381	17,05	19,35	20,27
	2382	17,17	19,24	20,27
	2383	16,02	17,78	18,74
	2384	19,37	21,41	22
	2385	19,56	20,24	21,26
7 (PPMO-1; 10 mg/kg)	2346	19,43	21,36	22,54
	2347	20,23	21,43	21,7
	2348	17,1	19,67	21,11
	2349	17,28	18,95	20,33
	2350	16,29	17,88	19,54
8 (PPMO-1; 20 mg/kg)	2306	17,75	19,24	20,28
	2307	18,61	19,94	21,18
	2308	18,49	20,86	21,54
	2309	17,7	18,89	20,73
	2310	17,88	19,14	20,87
9 (PPMO-1; 40 mg/kg)	2386	18,09	18,06	15,42
	2387	16,99	17,87	18,87
	2388	18,51	19,57	19,6
	2389	18,63	21,16	22,33
	2390	19,21	20,33	22,3
10 (PPMO-1; 80 mg/kg)	2401	18,05	19,9	20,89
	2402	19,76	21,33	23,12
	2403	17,77	19,79	20,4
	2404	18,68	19,65	21,22
	2405	17,74	19,44	20,1
11 (PPMO-5; 5 mg/kg)	2311	17,82	20,79	22,42
	2312	18,75	20,83	22,42
	2313	18,56	19,65	20,08
	2314	18,69	19,36	21,04
	2315	19,59	20,18	21,81
12 (PPMO-5; 10 mg/kg)	2316	17,15	19,79	19,66
	2317	19,26	20,41	21,44
	2318	20,42	21,83	23,67
	2319	17,6	18,48	20,23
	2320	19,05	20,38	21,78
13 (PPMO-5; 20 mg/kg)	2371	17,27	18,74	20,65
	2372	19,51	20,99	22,61
	2373	17,95	19,47	20,88

ES 2 901 772 T3

Grupo de tratamiento	Animal #	Llegada	Predosis	Preneropsia
	2374	21,1	24,15	24,22
	2375	17,85	19,7	21,63
14 (PPMO-5; 40 mg/kg)	2356	20,73	21,78	12,81 (FD)
	2357	18,89	20,89	21,11
	2358	18,15	19,93	21
	2359	18,27	19,09	20,11
	2360	18,24	20,31	21,48
15 (PPMO-5; 80 mg/kg)	2361	19,1	19,82	20,45
	2362	19,59	20,53	21,35
	2363	18	18,87	18,64
	2364	18,97	21,17	22,56
16 (PPMO-6; 5 mg/kg)	2365	19,03	20,91	20,99
	2301	20,42	23,02	23,95
	2302	18,59	21,24	21,87
	2303	18,82	20,78	21,53
	2304	18,41	20,22	21,24
17 (PPMO-6; 10 mg/kg)	2305	19,2	20,8	22,26
	2376	20,29	21,43	21,67
	2377	21,16	21,31	22,17
	2378	16,57	18,14	19,57
	2379	19,4	20,53	21,55
18 (PPMO-6; 20 mg/kg)	2380	18,18	20	20,42
	2421	22,54	24,92	25,91
	2422	18,98	20,33	21,09
	2423	17,76	20,01	20,84
	2424	18,53	20,67	21,11
19 (PPMO-6; 40 mg/kg)	2425	18,1	20,01	20,1
	2351	18,61	20,74	21,71
	2352	18,1	20,65	21,52
	2353	19,57	22,29	22,99
	2354	21,16	23,68	24,62
20 (PPMO-6; 80 mg/kg)	2355	18,53	20,62	21,32
	2326	19,16	19,81	22,3
	2327	19,47	19,77	21,23
	2328	19,4	20,83	22,41
	2329	19,02	19,27	20,43
21 (PPMO-7; 5 mg/kg)	2330	19,97	21,05	21,85
	2416	18,63	21,43	22,3
	2417	18,57	21,73	22,46
	2418	20,34	22,33	23,21
	2419	17,61	19,86	21,43
22 (PPMO-7; 10 mg/kg)	2420	21,96	22,24	23,41
	2366	19,05	21,41	17,85

Grupo de tratamiento	Animal #	Llegada	Predosis	Preneropsia
	2367	20,79	20,8	22,7
	2368	19,83	21,93	23,56
	2369	19,62	21,47	21,97
	2370	17,98	21,01	21,8
23 (PPMO-7; 20 mg/kg)	2341	18,39	19,79	20,85
	2342	19,93	19,9	20,17
	2343	18,06	19,44	21,1
	2344	18,76	21,15	21,38
	2345	22,35	23,99	24,55
24 (PPMO-7; 40 mg/kg)	2321	20,83	22,31	22,58
	2322	20,79	21,57	22,21
	2323	19,99	19,79	21,29
	2324	18,1	17,99	18,19
	2325	18,58	19,77	20,93
25 (PPMO-7; 80mg/kg)	2331	19,91	20,46	21,98
	2332	19,55	21,11	22,63
	2333	18,8	18,51	19,65
	2334	20,64	19,79	19,9
	2335	20,61	23,11	22,86
Reserva	2337	21,03	23,08	23,22
	2338	21,14	22,31	23,76
	2339	20,39	21,22	21,07
	2340	21,24	23,82	23,78

Resultados – Análisis de PCR

5 El ARN del tejido del cuádriceps, el corazón y el diafragma de los ratones se purificó utilizando los kits de extracción de 96 pocillos de GE Illustra RNAspin. Brevemente, se añadieron 400 µL, de amortiguador de lisis (RA1 + 1 % 2-mercaptoetanol a aproximadamente 20-30 mg de tejido congelado en una placa con perlas de circonio (Biospec) y se homogeneizó utilizando GenoGrinder (Spex Sample Prep) a 4 x 8 minutos a 1750 RPM; enfriando entre cada pasada. El homogeneizado se procesó inmediatamente para la purificación del ARN según el protocolo de GE RNAspin Illustra de 10 96 pocillos. El ARN total se cuantificó con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (ThermoScientific).

10 El ARN se analizó mediante una reacción de PCR anidada clásica. Los reactivos de la RT-PCR eran de Invitrogen, a menos que se especifique lo contrario. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador CFX96 o S1000 (BioRad). Los productos finales de ADNc se separaron en un gel de corrida con TBE al 10% NuPage (Invitrogen) a 200V, 15 1 hora a temperatura ambiente. Los geles se escanearon con un Typhoon Trio (GE Healthcare) utilizando un filtro de emisión 670 BP 30 Cy5 y se analizaron con el software ImageQuant.

20 Los iniciadores utilizados para el análisis de PCR fueron los siguientes: la distrofina sentido exterior (5'-CAATGTTTCTGGATGCAGACTTTGTGG-3'; SEQ ID NO:9), distrofina antisentido reverso (5'-GTTGAGCTTCACTCTTTATCTTCTGCC-3'; SEQ ID NO:10), distrofina sentido interior (5'-CACATCTTTGATGGTGTGAGG-3'; SEQ ID NO:11), y distrofina antisentido interior (5'-CAACTTCAGCCATCCATTTCTG-3'; SEQ ID NO: 12). Las reacciones de PCR se realizaron de acuerdo con los protocolos descritos en la tabla 6, y los resultados se resumen en la tabla 7 y las figuras 3-5.

Tabla 6. Método de PCR

Configuración de la reacción para la RT-PCR y la amplificación primaria (reacción de 25 µL)			
Mezcla de reacción 2x	12,5 µL		

ES 2 901 772 T3

Iniciador sentido exterior <i>Dys</i> (30 μ M)	0,25 μ L		
Iniciador antisentido exterior <i>Dys</i> (30 μ M)	0,25 μ L		
Mezcla Superscript III μ Latinum <i>Taq</i>	1 μ L		
ARN de plantilla (10 ng/ μ L)	5 μ L		
Agua hasta 25 μ L de volumen total	6 μ L		
Añadir 20 μ L de MM + 5 μ L de muestra a la placa de reacción. Agitar la placa y girar brevemente para asegurarse de que todo el líquido está en el fondo del pocillo. Ejecutar el programa de amplificación.			
Programa de RT-PCR y amplificación primaria			
	Temperatura	Tiempo	
Transcripción inversa	55 °C	30 minutos	
Inactivación RT	94 °C	2 minutos	
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	8 ciclos
Alineamiento	59 °C	1 minuto	
Extensión	68 °C	1 minuto	
	4 °C	(retener)	
Preparación de la reacción para la amplificación secundaria anidada (reacción de 30 μL)			
Amortiguador PCR 10x	3 μ L		
Solución de dNTP (10 mM)	0,3 μ L		
50 mM MgCl	0,9 μ L		
Iniciador sentido interior <i>Dys</i> (30 μ M)	0,2 μ L		
Iniciador antisentido interior <i>Dys</i> (30 μ M)	0,2 μ L		
Polimerasa platinum ADN <i>taq</i>	0,15 μ L		
0,1 mM Cy5-dCTP	0,6 μ L		
Producto RT-PCR	2 μ L		
Agua hasta 30 μ L de volumen total	22,65 μ L		
Añadir 28 μ L de MM + 2 μ L de pílora de reacción a la segunda placa de reacción; agitar, centrifugar, ejecutar el programa de amplificación secundaria.			
Programa de amplificación secundaria anidada			
	Temperatura	Tiempo	
Desnaturalización primaria	94 °C	3 minutos	

Desnaturalización	94 °C	45 segundos	22 ciclos
Alineamiento	59 °C	30 segundos	
Extensión	68 °C	1 minuto	
	4 °C	(retener)	

Tabla 7. Resumen del % de omisión del exón 23

Grupo objetivo	Conjugado de péptido-oligómero	Dosis objetivo (mg/kg)	Cuádriceps (I)		Diafragma		Corazón	
			% de omisión del exón 23 (promedio)	Error (SD)	% de omisión del exón 23 (promedio)	Error (SD)	% de omisión del exón 23 (promedio)	Error (SD)
1	PPMO-4	5	7	5	0	0	0	0
2		10	24	20	13	4	5	2
3		20	76	9	67	13	25	6
4		40	89	7	90	5	89	2
5		80	93	4	93	2	95	1
6	PPMO-1	5	0	0	0	0	0	0
7		10	8	9	6	6	0	0
8		20	24	20	16	12	5	4
9		40	81	7	73	12	62	17
10		80	91	3	92	3	92	2
11	PPMO-5	5	1	2	0	0	0	0
12		10	0	0	1	2	0	0
13		20	29	20	9	2	2	1
14		40	76	11	75	10	34	13
15		80	93	3	91	3	91	3
16	PPMO-6	5	7	5	3	3	0	0
17		10	16	11	15	11	3	3
18		20	53	22	44	13	30	16
19		40	85	14	90	4	81	14
20		80	91	3	95	2	96	1
21	PPMO-7	5	4	3	1	1	0	0
22		10	11	5	6	2	2	2
23		20	53	17	30	12	13	7
24		40	89	2	67	21	42	10
25		80	92	2	93	3	93	3

5 **Ejemplo 4:** Estudio de la dosis máxima tolerada de compuestos modificados con enlazadores en ratones MDX

La dosis máxima tolerada (MTP, por sus siglas en inglés) de los conjugados de péptido-oligómero seleccionados de la divulgación se determinó en ratones según los regímenes mostrados en la tabla 8. Los resultados se resumen en la tabla 9, que indica que todos los compuestos, excepto PPMO-5, tienen una MTD de entre 150 y 200 mg/kg. El PPMO-5 tiene una MTD > 200 mg/kg. Las observaciones en vida durante el estudio de MTD se resumen en la tabla 10.

Tabla 8. Estudio de la MTD

Grupo n=3	Compuesto	Dosis por inyección (mg/kg)	Régimen	Vía de administración
1	PPMO-4	50	Inyección única	i.v., por la cola 200 µL
2		100		
3		150		
4		200		
5	PPMO-1	50		
6		100		
7		150		
8		200		
9	PPMO-5	50		
10		100		
11		150		
12		200		
13	PPMO-6	50		
14		100		
15		150		
16		200		
17	PPMO-7	50		
18		100		
19		150		
20		200		

Tabla 9. % de supervivencia con la MTD

Compuesto	Dosis (mg/kg)					% de supervivencia
	50	100	150	200	400	
PPMO-4	100	100	100	0	ND	% de supervivencia
PPMO-1	100	100	100	33	ND	
PPMO-5	100	100	100	100	ND	
PPMO-6	100	100	100	0	ND	
PPMO-7	100	100	100	33	ND	
PPMO-8	100	100	100	100	100	

Tabla 10. Observaciones de la MTD en vida

PPMO-4	
100 mg/kg	3/3 lentos para recuperarse a los 15 minutos, bien a las 2 horas
150 mg/kg	3/3 letárgicos a los 15 min, bien a las 2 horas
200 mg/kg	3/3 letárgicos a los 15 min y a las 2 horas, 3/3 muertos a las 24 horas

PPMO-1	
100 mg/kg	3/3 lento para recuperarse a los 15 minutos, bien a las 2 horas
200 mg/kg	3/3 letárgicos a los 15 min, 1/3 muerto a las 2 horas, 2/3 letárgico a las 2 horas
	otro murió antes de las 24 horas (total 2/3 muertos)
PPMO-5	
200 mg/kg	3/3 letárgico a los 15 min, bien a las 2 horas
PPMO-6	
150 mg/kg	3/3 lentos para recuperarse a los 15 min, lentos para moverse a las 2 horas
200 mg/kg	3/3 lentos en recuperarse a los 15 min, letárgicos a las 2 horas, 3/3 muertos a las 24 horas
PPMO-7	
100 mg/kg	3/3 lento para recuperarse a los 15 minutos, bien a las 2 horas
150 mg/kg	3/3 lento para recuperarse a los 15 minutos, bien a las 2 horas
200 mg/kg	2/3 muertos a los 15 minutos, 1/3 letárgicos a los 15 minutos y a las 2 horas

5 En resumen, la modificación de la longitud del enlazador de un conjugado de péptido-oligómero conduce a una mayor potencia, aunque la tolerabilidad puede verse reducida. El PPMO-4 mostró una mayor potencia que el PPMO-8 (la ED₄₀ del PPMO-4 es aproximadamente tres veces mayor que la del PPMO-8) y mostró una mayor eficacia que el PPMO-2 en todos los tipos de tejidos ensayados. La toxicidad también parece verse afectada por la longitud del enlazador, ya que se demostró que un enlazador PEG-3 aumentaba la eficacia, pero también la toxicidad (figura 10).

10 Todos los compuestos mostraron una elevación superior a diez veces de KIM-1 a partir de 50 mg/kg, lo que sugiere que los compuestos no fueron bien tolerados (figura 9). Las dosis de 200 mg/kg de PPMO-1 y PPMO-7 mostraron un KIM-1 inferior al esperado, lo que se observó anteriormente con el PPMO-2 y podría deberse a una necrosis grave en el riñón. El PPMO-7 (todo aminoácido D) mejoró la eficacia, pero no fue bien tolerado y aumentó los marcadores de química sérica del hígado y del riñón, en particular a dosis altas (figura 7). El PPMO-6 también mejoró la eficacia, pero no fue bien tolerado y aumentó los niveles de KIM-1 (figuras 6-9).

15 **Ejemplo 5:** Índice terapéutico

El índice terapéutico (TI, por sus siglas en inglés) puede determinarse según la siguiente ecuación:

$$TI = \frac{MTD}{ED_{40}}$$

20 donde ED se refiere a la dosis eficaz.

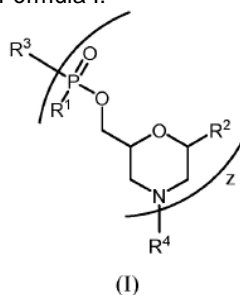
Es importante destacar que la toxicidad de un conjugado de péptido-oligómero puede describirse en dos fases: t₁ y t₂. La t₁ se refiere a la muerte rápida, o a la muerte en 48 horas, muy probablemente debida al colapso cardiopulmonar. La t₂ se refiere a la toxicidad renal crónica, observada con un conjugado de péptido-oligómero después de múltiples dosis semanales. Las mediciones de la MTD descritas en la presente se refieren a la toxicidad t₁ (criterio de valoración de 48 horas).

30 Así, según las mediciones de las muestras de cuádriceps, el IT del PPMO-8 es de 16,6 (400 mg/kg de MTD; 24 mg/kg de ED₄₀). Aunque el PPMO-4 tiene una MTD inferior a la del PPMO-8, la dosis efectiva es la mitad de la del PPMO-8, lo que da lugar a un IT inferior a 14,6. Asimismo, el PPMO-2 tiene una MTD de unos 60 mg/kg y una ED₄₀ de 10 mg/kg, lo que da lugar a un IT de 6.

A menos que se defina lo contrario, a todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente se les otorga el significado comúnmente conocido por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica.

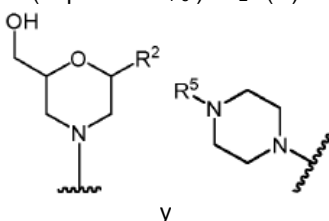
REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I:



5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:

R³ se selecciona de OH, -N(H)CH₂C(O)NH₂, -N(alquilo de C₁₋₆)CH₂C(O)NH₂,



10 R⁵ es -C(O)(O-alquilo)_xOH, en donde x es 3-10 y cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C₂₋₆, o R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C(O)alquilo de C₁₋₆, tritilo, monometoxitilo, -(alquilo de C₁₋₆)-R⁶, -(heteroalquilo de C₁₋₆)-R⁶, arilo-R⁶, heteroarilo-R⁶, -C(O)O-(alquilo de C₁₋₆)-R⁶, -C(O)O-arilo-R⁶, -C(O)O-heteroarilo-R⁶, y R¹²;

R⁶ se selecciona de OH, SH y NH₂, o R⁶ es O, S o NH, enlazado covalentemente a un soporte sólido;

R¹ es, independientemente en cada caso, OH, -NR⁷R¹², o -NR⁷R⁸;

15 cada R⁷ y R⁸ son, independientemente en cada caso, H o alquilo de C₁₋₆;

R² es, independientemente en cada caso, seleccionado del grupo que consiste en H, una nucleobase funcionalizada con un grupo químico protector, en donde la nucleobase, independientemente en cada caso, comprende un anillo heterocíclico de C₃₋₆ seleccionado entre piridina, pirimidina, triazinano, purina y deaza-purina;

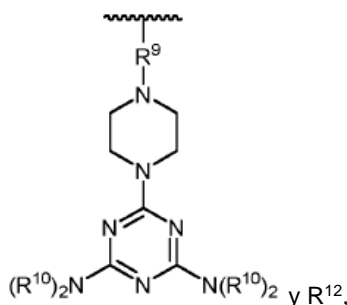
20 en donde el grupo protector químico se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, acetal, acetilo, terc-butildimetilsililo y bencilo para los grupos hidroxilo,

en donde el grupo protector químico se selecciona del grupo que consiste en tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, acetal, terc-butildimetilsililo, metilo, etilo, 2,4-dimetoxibencilo y bencilo para los grupos carboxilo, y

25 en donde el grupo protector químico se selecciona del grupo que consiste en trifluoroacetilo, carboxibencil, terc-butiloxycarbonilo, sililocarbonilo y fluorenilmetiloxycarbonilo para los grupos amina;

z es 8-40;

R⁴ se selecciona de H, -alquilo de C₁₋₆, -C(O)alquilo de C₁₋₆, benzoilo, estearoilo, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo,

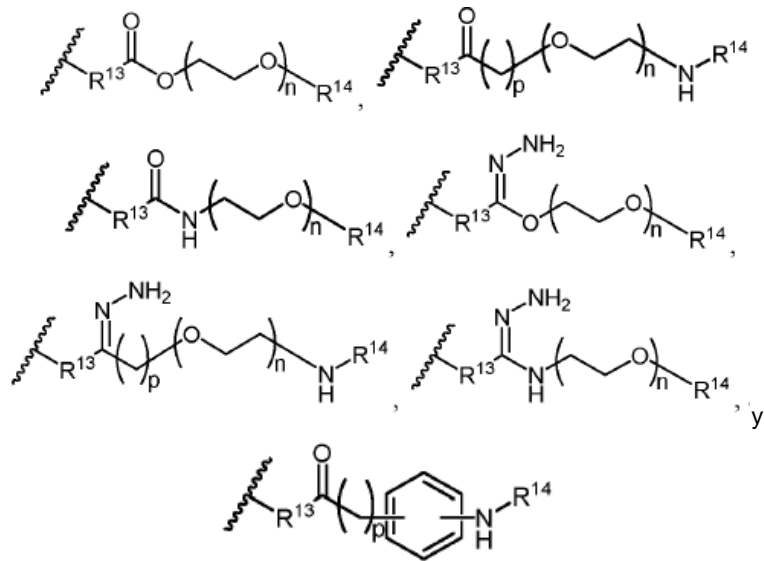


30 R⁹ es -C(O)(CH₂)₆C(O)- o -C(O)(CH₂)₂S₂(CH₂)₂C(O)-;

R¹⁰ es -(CH₂)₂OC(O)N((CH₂)₆N(H)C(=NH)NH₂)₂;

R¹¹ se selecciona de OH y -NR⁷R⁸;

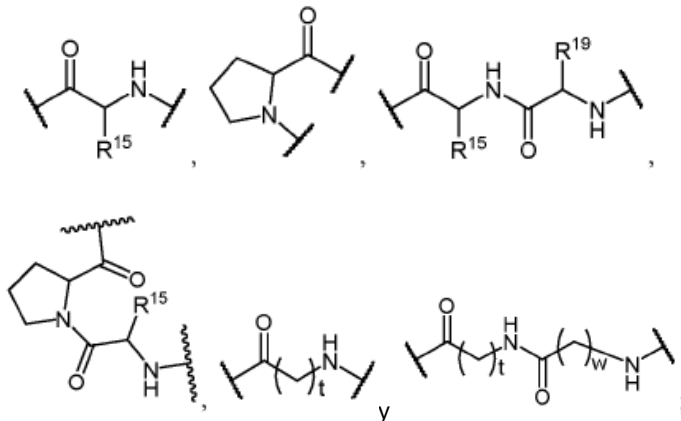
35 R¹² se selecciona del grupo que consiste en:



n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10;

5 p es 2, 3, 4, o 5;

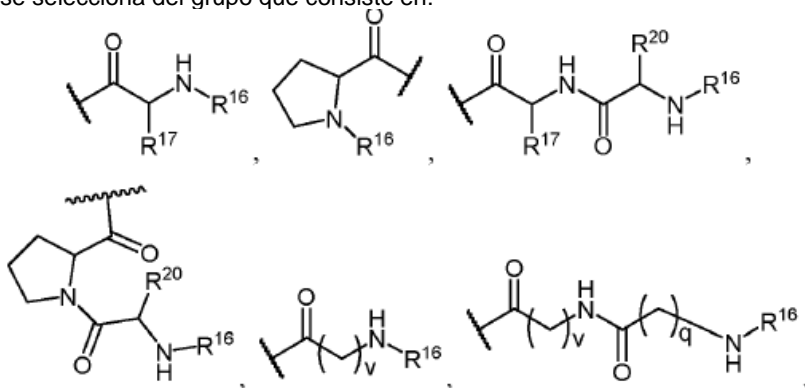
R¹³ es un enlace, o R¹³ se selecciona del grupo que consiste en:

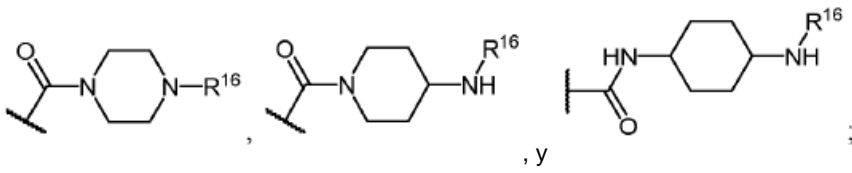


10 R¹⁵ y R¹⁹ se seleccionan, independientemente en cada caso, del grupo que consiste en H, -alquilo de C₁₋₄, -CH(alquilo de C₁₋₄)₂, y -(CH₂)₃NH-C(=NH)-NH₂;

t y w son, independientemente en cada caso, 2, 3, 4 o 5;

15 R¹⁴ se selecciona del grupo que consiste en:





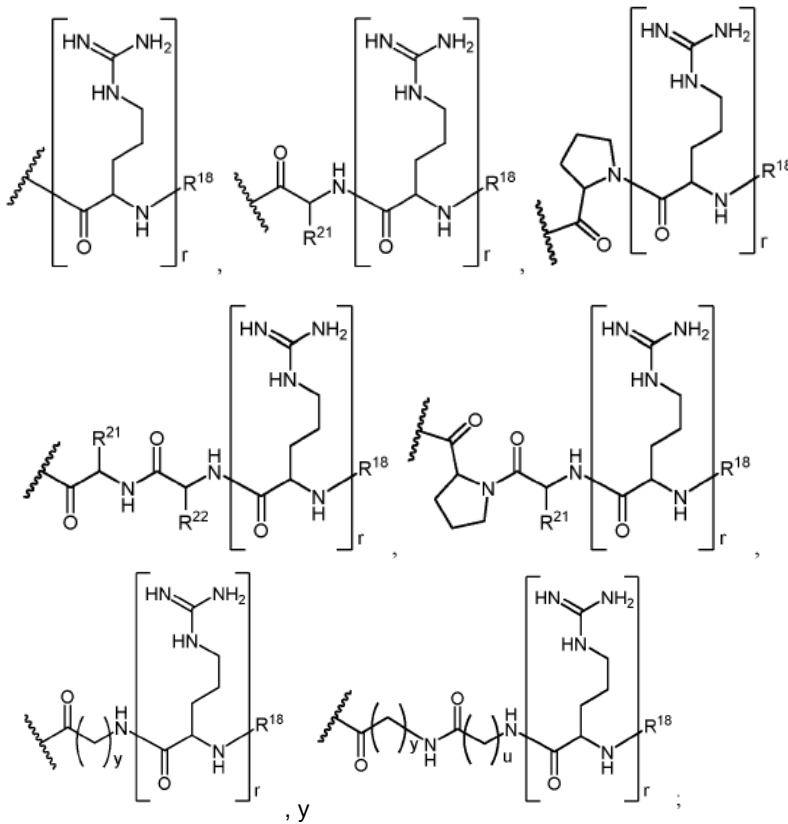
R¹⁷ es H o -alquilo de C₁₋₄;

5 R¹⁹ se selecciona del grupo que consiste en H, -alquilo de C₁₋₄, -CH(-alquilo de C₁₋₄)₂, y -(CH₂)₃NH-C(=NH)-NH₂;

v y q son, independientemente en cada caso, 2, 3, 4 o 5;

R¹⁶ se selecciona del grupo que consiste en:

10



15 R²¹ y R²² son, independientemente en cada caso, H o -alquilo de C₁₋₄;

R¹⁸ se selecciona del grupo que consiste en:

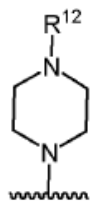
H, -C(O)alquilo de C₁₋₆, benzoilo y estearoilo;

20

r es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9; y

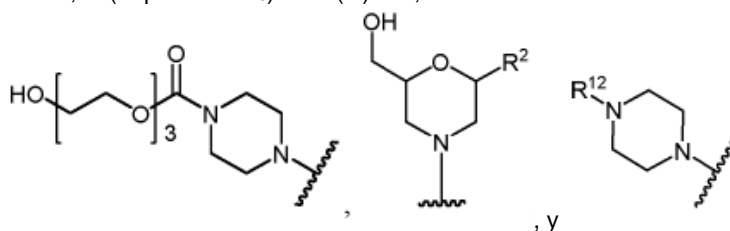
y y u son, independientemente en cada caso, 2, 3, 4 o 5;

25 siempre que se dé una de las siguientes condiciones: 1) R¹ es NR⁷R¹²; o 2) R⁴ es R¹²; o 3) R³ es;

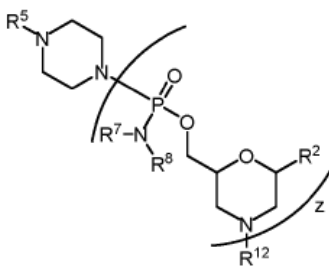


2. El conjugado de péptido-oligómero de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en

donde R³ se selecciona de -OH, -N(alquilo de C₁₋₆)CH₂C(O)NH₂,



3. El conjugado de péptido-oligómero de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ia:

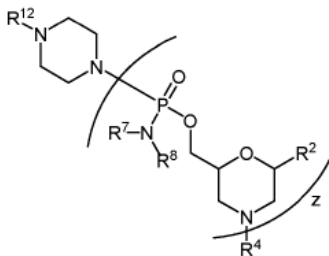


(Ia),

en donde R⁵ es -C(O)(O-alquilo)_xOH, en donde x es 3-10 y cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C₂₋₆, o R⁵ se selecciona del grupo que consiste en -C(O)alquilo de C₁₋₆, tritilo y monometoxitritilo.

4. El conjugado de péptido-oligómero de la reivindicación 1 o 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R⁵ es -C(O)(O-alquilo)_xOH, en donde cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C₂₋₆.

5. El conjugado de péptido-oligómero de la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ib:



(Ib),

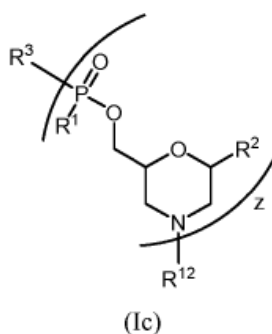
en donde R⁴ se selecciona de H, -alquilo de C₁₋₆, -C(O)alquilo de C₁₋₆, benzoilo, estearoilo, tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo y trimetoxitritilo

6. El conjugado de péptido-oligómero de la reivindicación 1 o 5, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R⁴ se selecciona de H y -C(O)CH₃.

7. El conjugado de péptido-oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde r es 3, 4, 5, 6, 7 u 8, preferiblemente en donde r es 5, 6 o 7, más preferiblemente en donde r es 6.

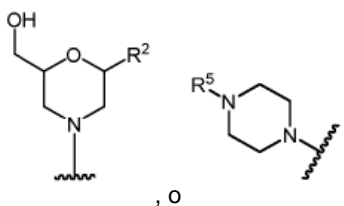
8. El conjugado de péptido-oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde cada R¹ es independientemente NR⁷R⁸, en donde cada R⁷ y R⁸ son, independientemente en cada caso, alquilo de C₁₋₃.

9. El conjugado de péptido-oligómero de la reivindicación 1, en donde el conjugado de péptido-oligómero de Fórmula I es un conjugado de péptido-oligómero de Fórmula Ic:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
en donde:

R³ es OH,



5

R⁵ es -C(O)(O-alkilo)_xOH, en donde x es 3-10 y cada grupo alquilo es, independientemente en cada caso, alquilo de C₂₋₆, o R⁵ -C(O)alquilo de C₁₋₆;

R¹ es, independientemente en cada caso, OH o -NR⁷R⁸;

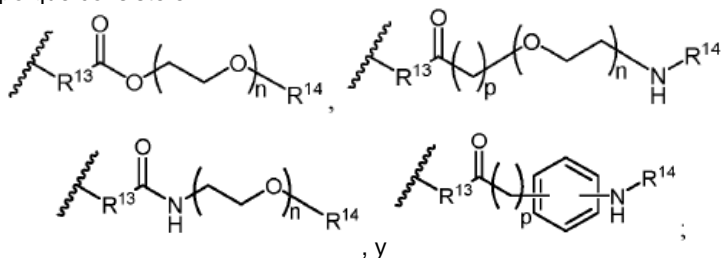
cada R⁷ y R⁸ son, independientemente en cada caso, -alquilo de C₁₋₆;

10

R² es independientemente en cada caso, seleccionado del grupo que consiste en H, adenina, 2,6-diaminopurina, 7-deaza-adenina, guanina, 7-deaza-guanina, hipoxantina, citosina, 5-metil-citosina, timina y uracilo;

z es 8-40;

R¹² se selecciona del grupo que consiste en:



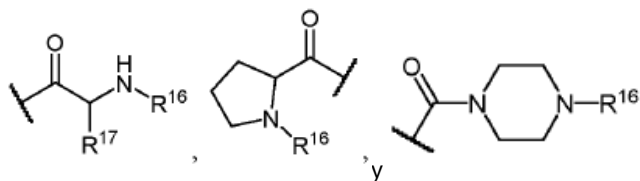
15

n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10;

p es 2, 3, 4, o 5;

R¹³ es un enlace;

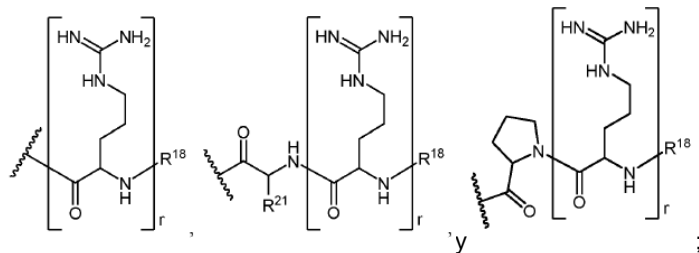
R¹⁴ se selecciona del grupo que consiste en:



20

R¹⁷ es H o -alquilo de C₁₋₄;

R¹⁶ se selecciona del grupo que consiste en:



25

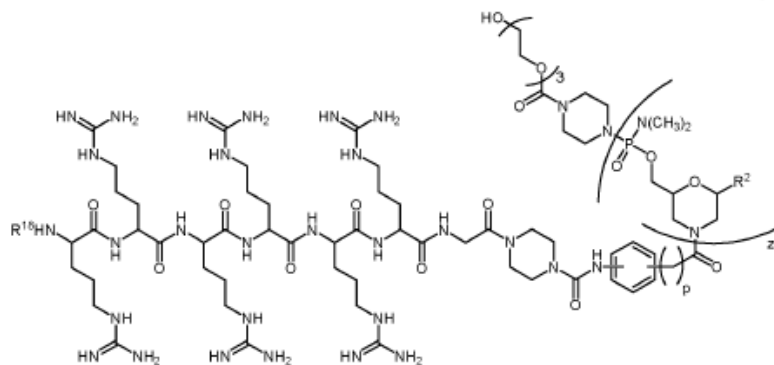
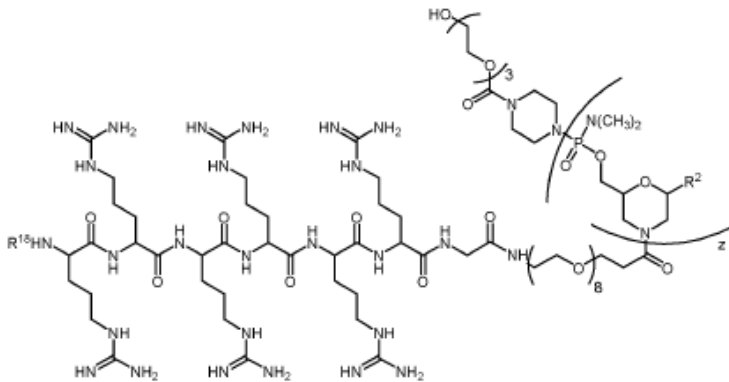
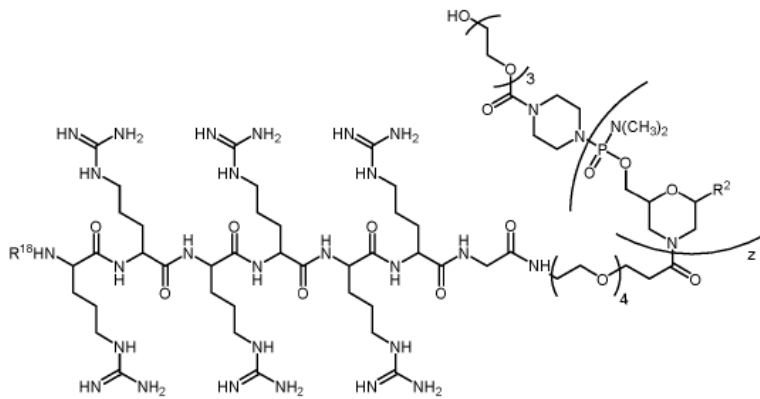
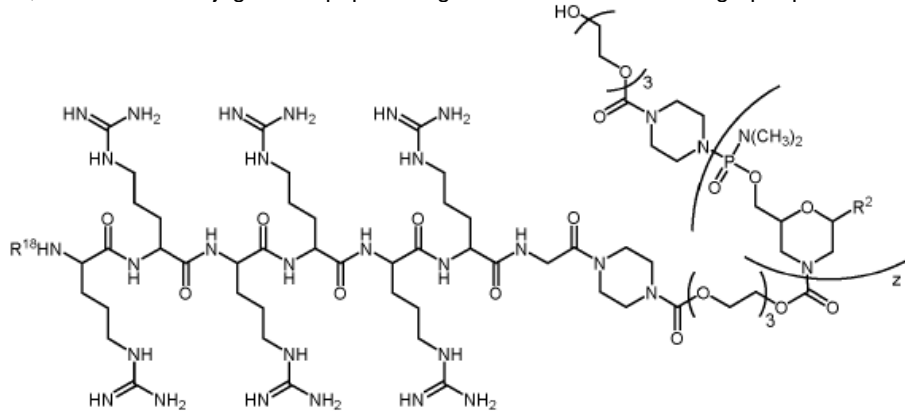
R²¹ es H o -alquilo de C₁₋₄;

R¹⁸ es H o -C(O)alquilo de C₁₋₄; y

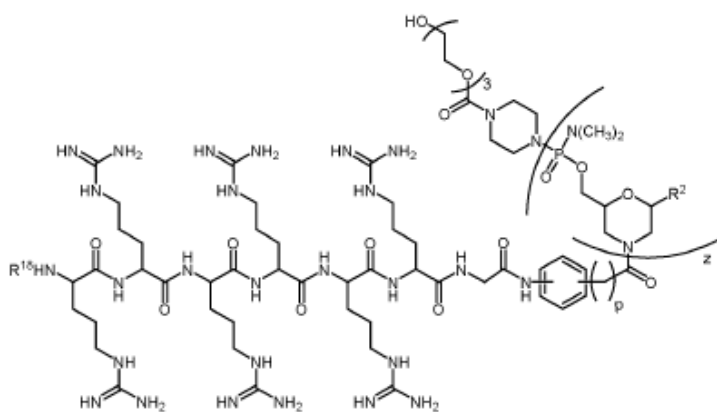
r es 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9.

10. El conjugado de péptido-oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde R^2 , independientemente en cada caso, se selecciona del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, 5-metil-citosina, timina, uracilo e hipoxantina.

5 11. El conjugado de péptido-oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 9 y 10, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el conjugado de péptido-oligómero se selecciona del grupo que consiste en:



y



en donde
 R^{18} se selecciona de H y $-C(O)CH_3$.

- 5 12. El conjugado de péptido-oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 1-11, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde el conjugado de péptido-oligómero comprende una secuencia de direccionamiento que tiene una complementariedad de secuencia del 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 100% con un objetivo de ARN.
- 10 13. El conjugado de péptido-oligómero de la reivindicación 12, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde la secuencia de direccionamiento tiene una complementariedad de secuencia del 100% con el objetivo de ARN.
14. Un conjugado de péptido-oligómero de cualquiera de las reivindicaciones 1-13 para su uso en el tratamiento de un trastorno del sistema nervioso central, una enfermedad muscular, una infección viral o una infección bacteriana en un sujeto en necesidad del mismo.
- 15 15. El conjugado de péptido-oligómero para su uso de la reivindicación 14, en donde la enfermedad muscular es la distrofia muscular de Duchenne, o en donde la infección viral es causada por un virus seleccionado entre el virus de Marburgo, el virus del ébola, el virus de la gripe, y el virus del dengue, o donde la infección bacteriana es causada por *Mycobacterium tuberculosis*, o en donde el trastorno del sistema nervioso central es la atrofia muscular espinal.
- 20

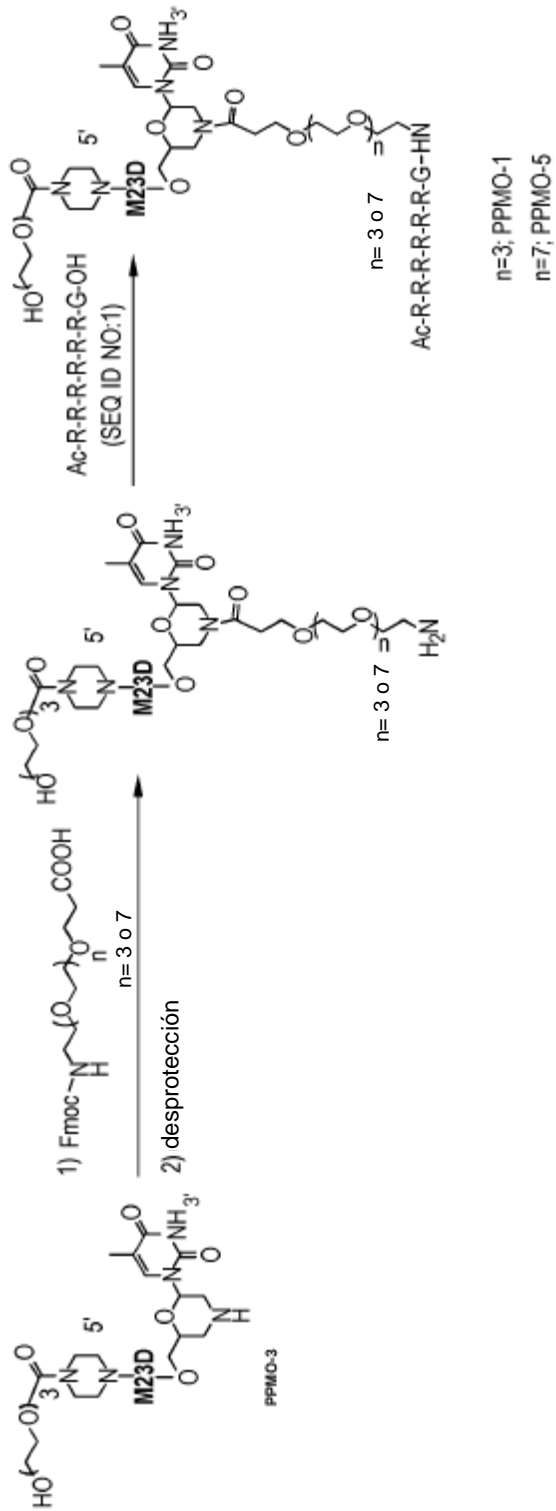


Figura 1

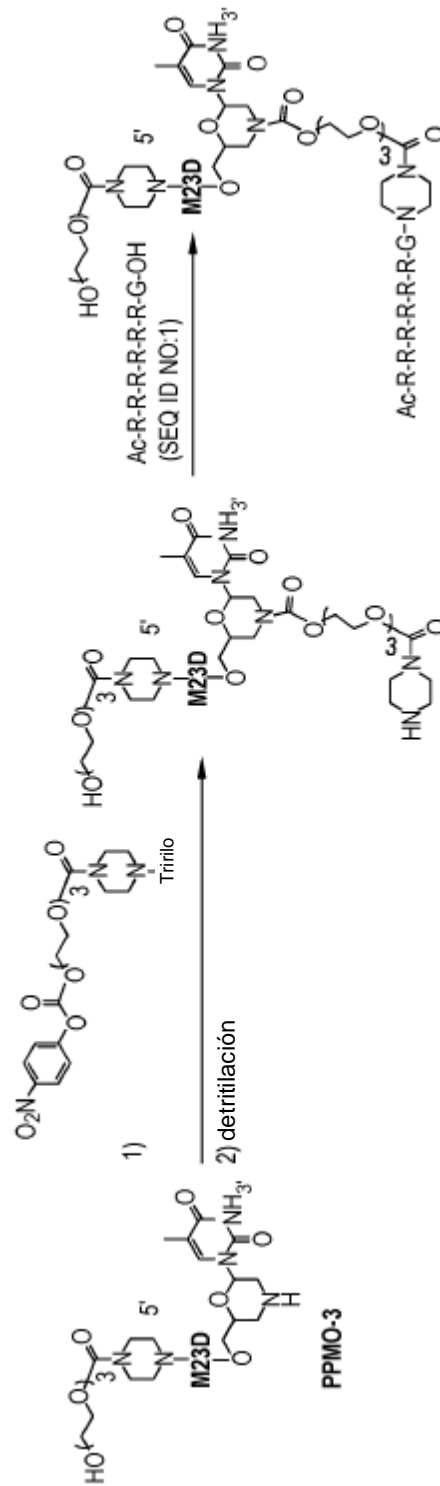


Figura 2

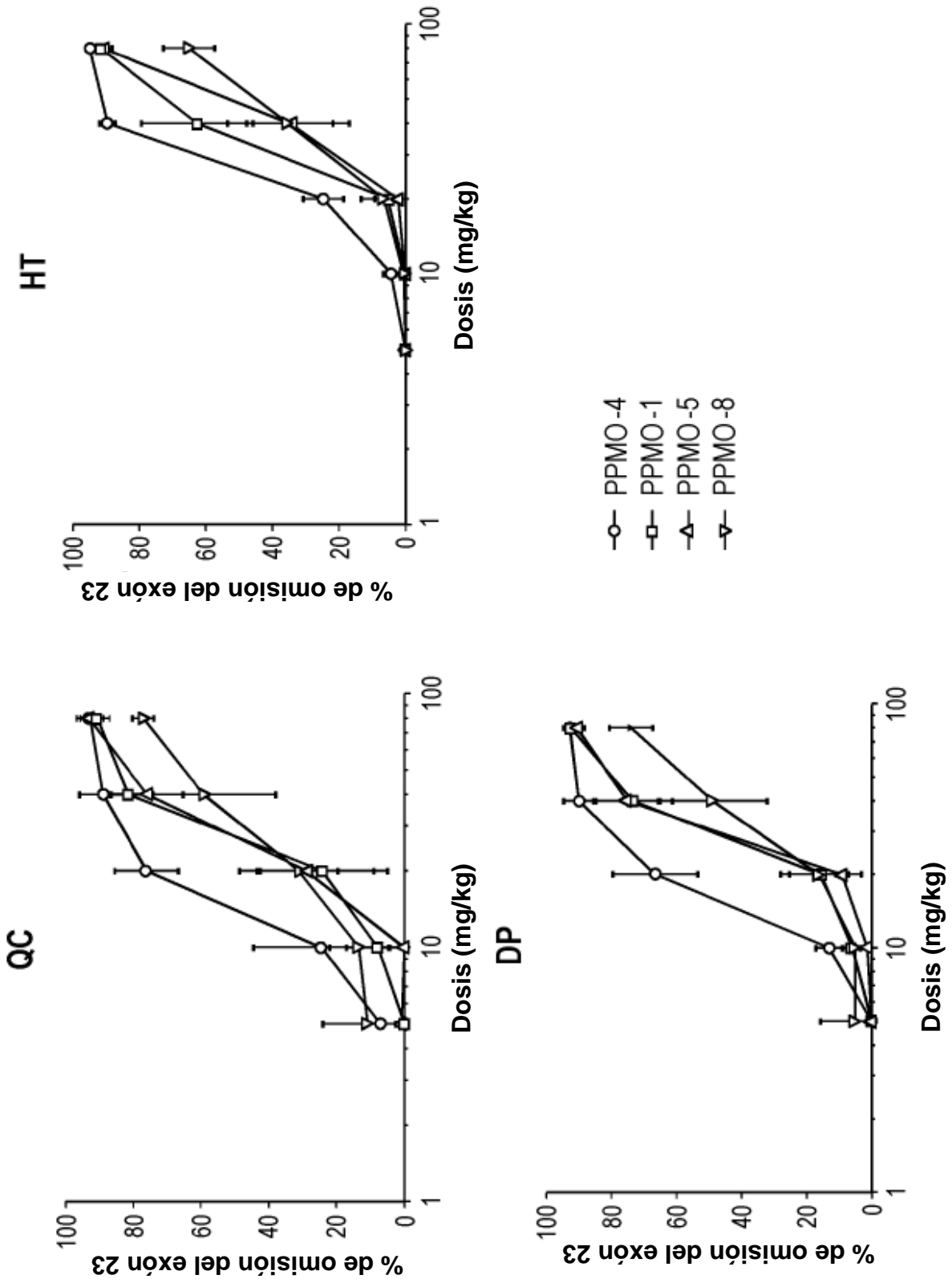


Figura 3

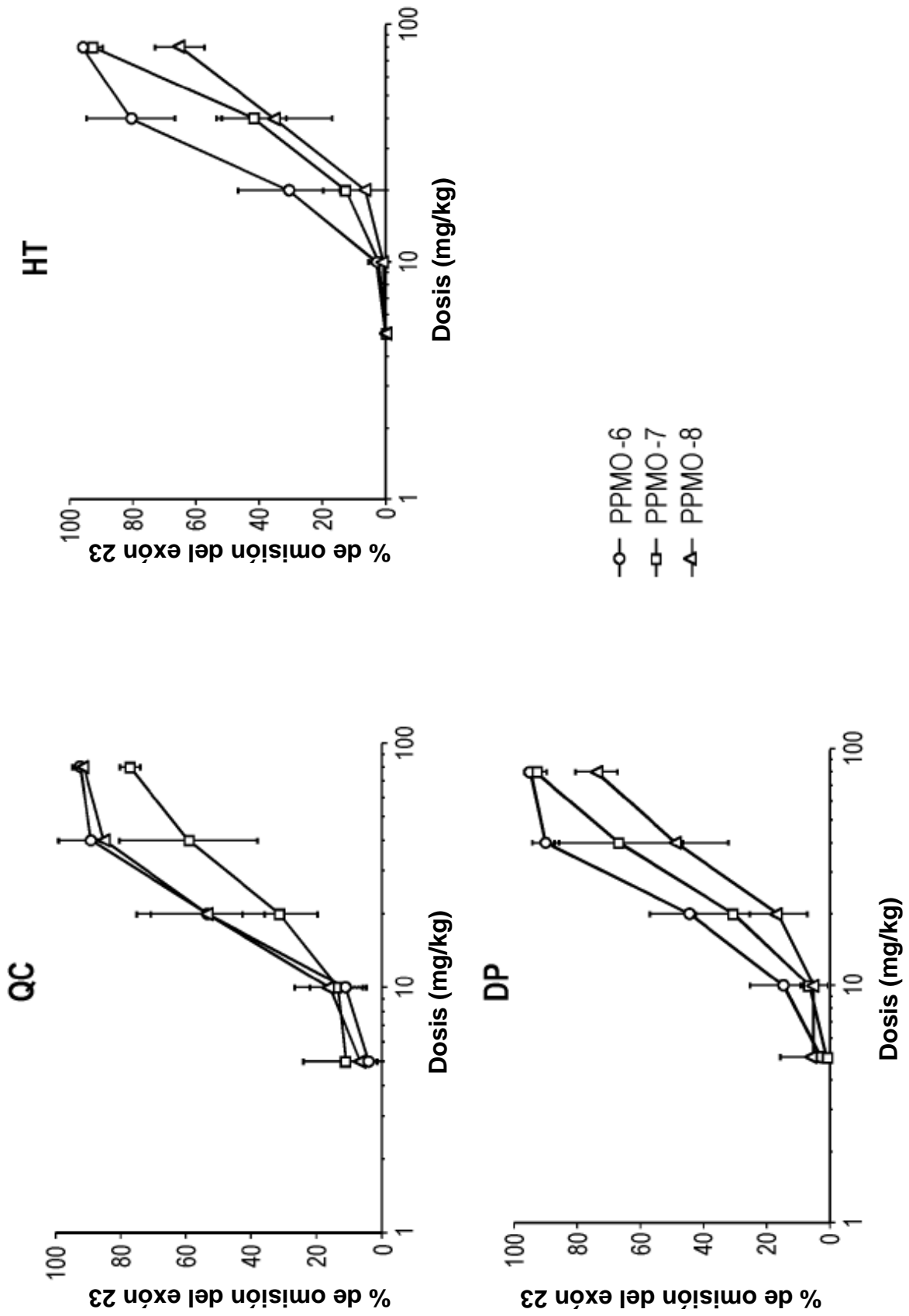


Figura 4

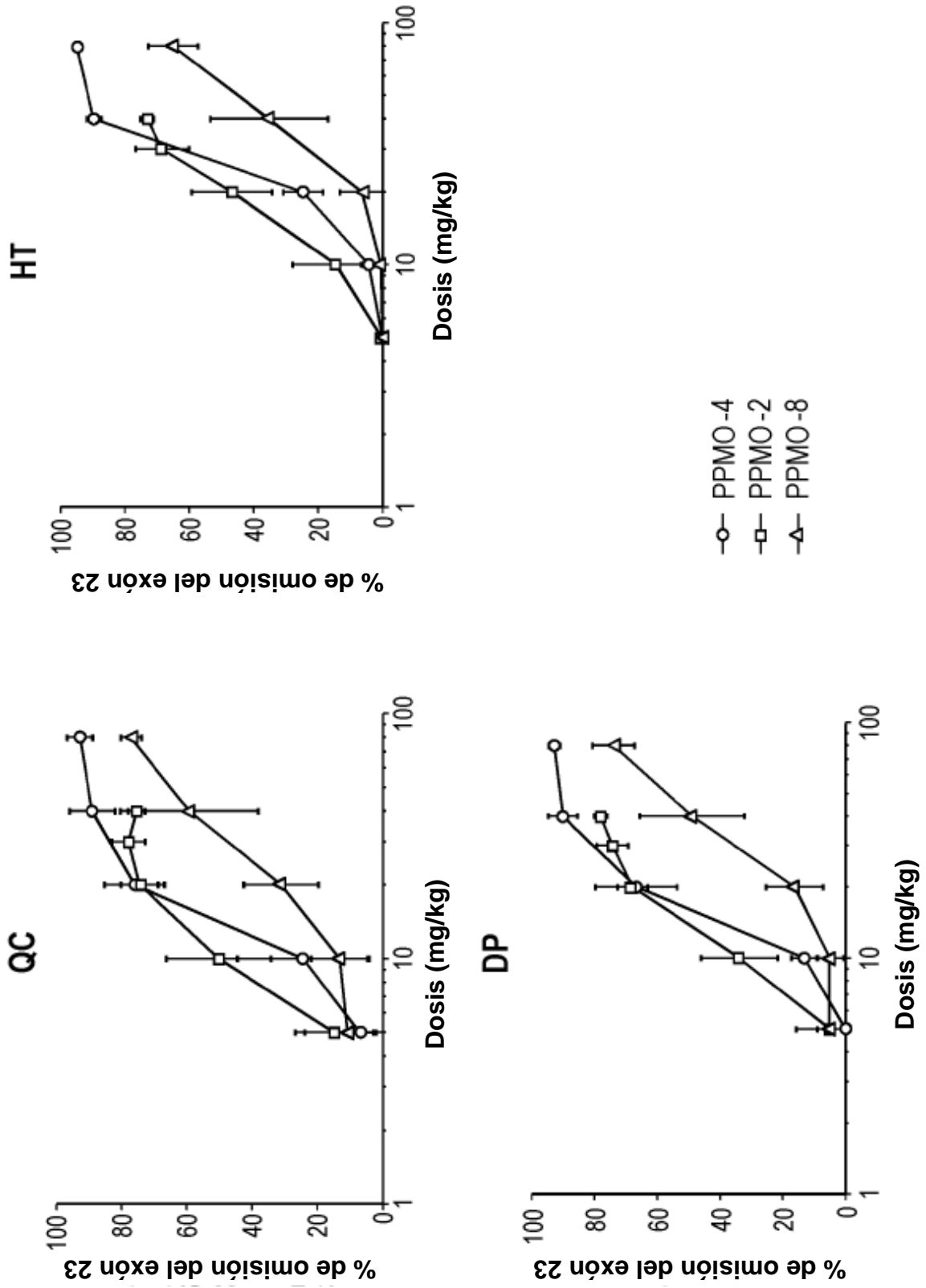


Figura 5

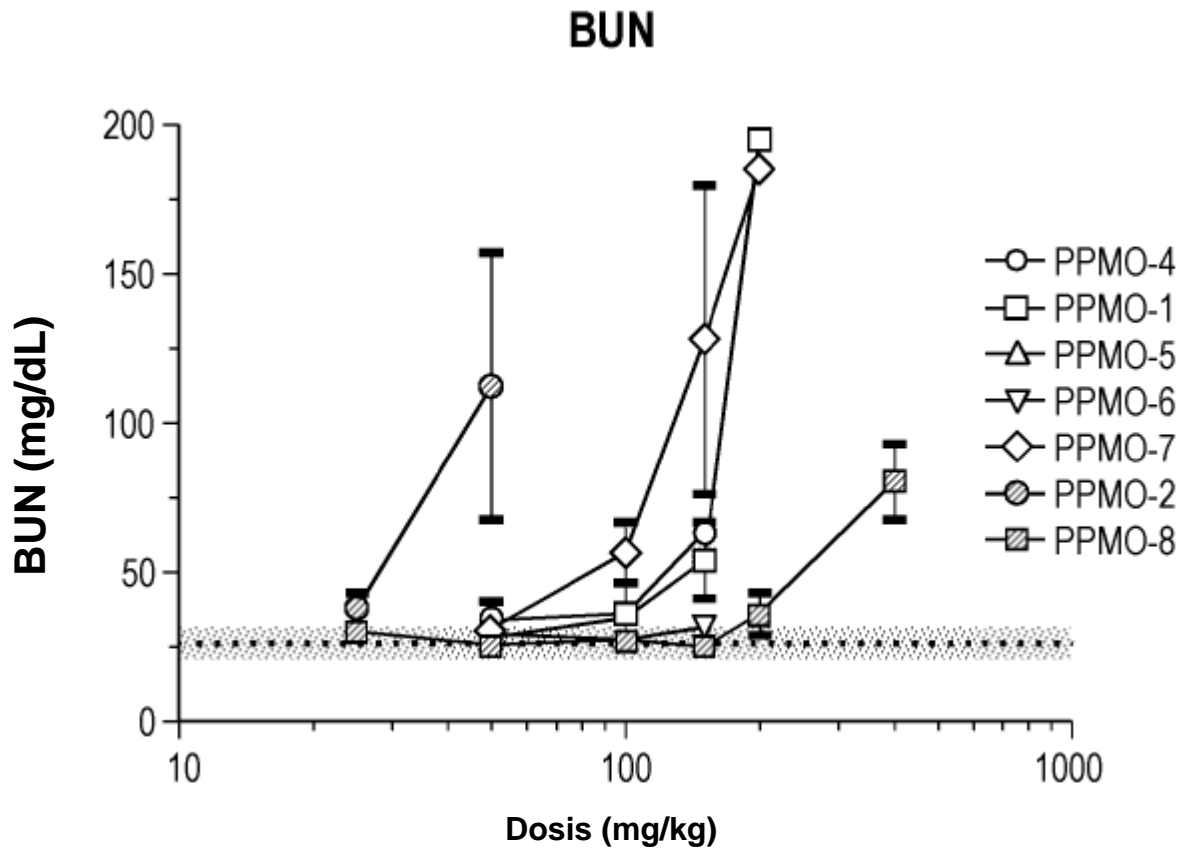


Figura 6

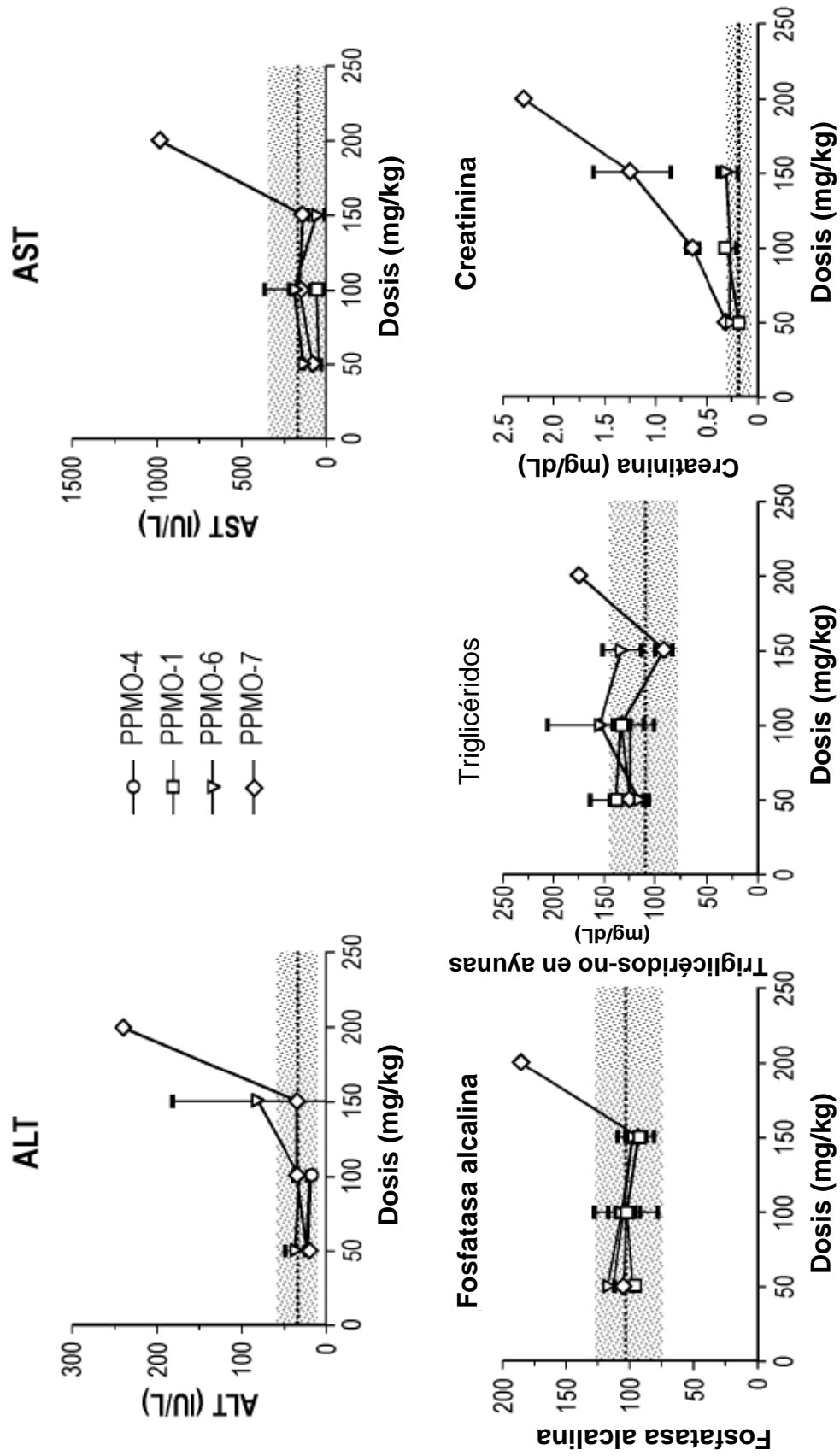


Figura 7

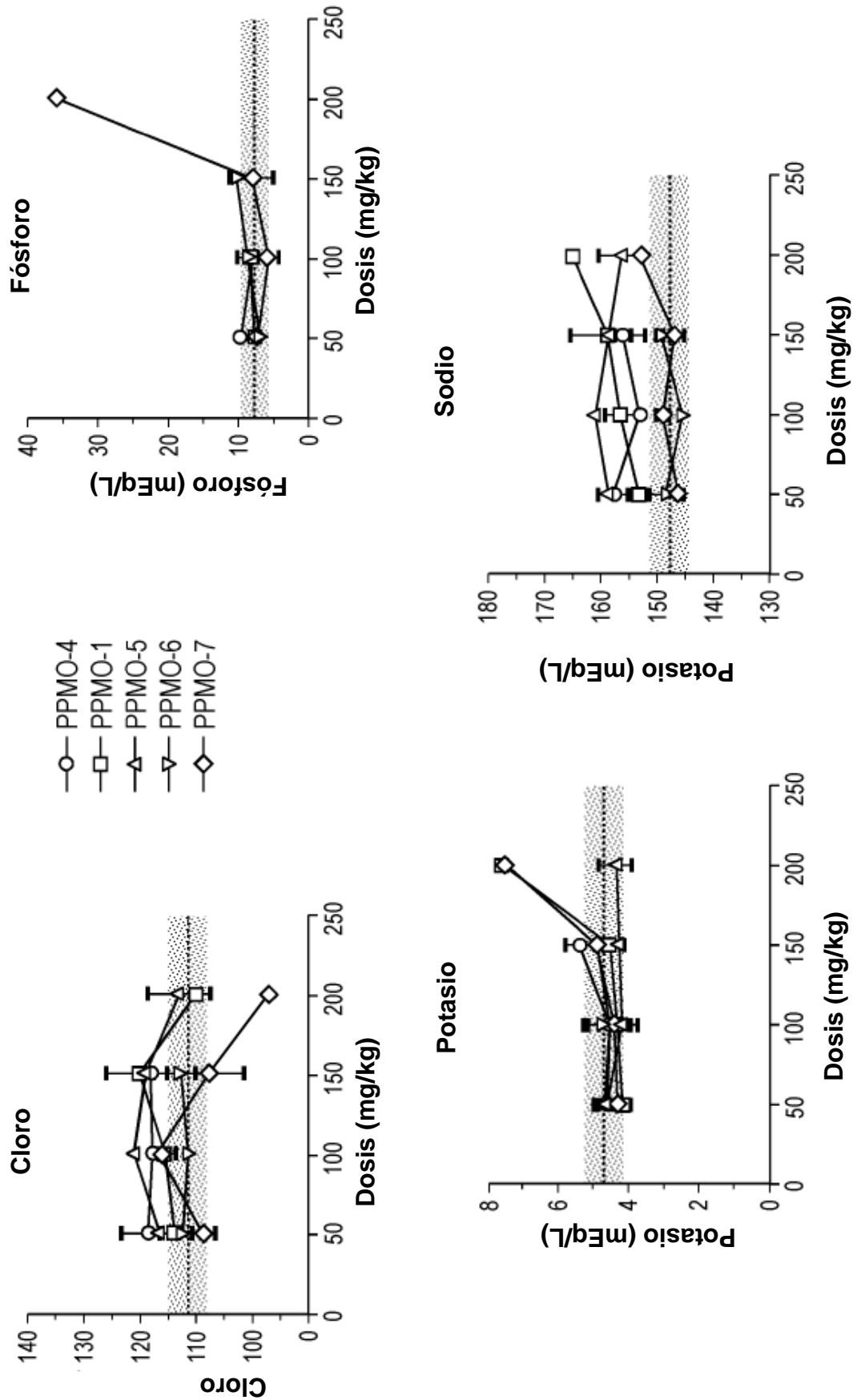


Figura 8

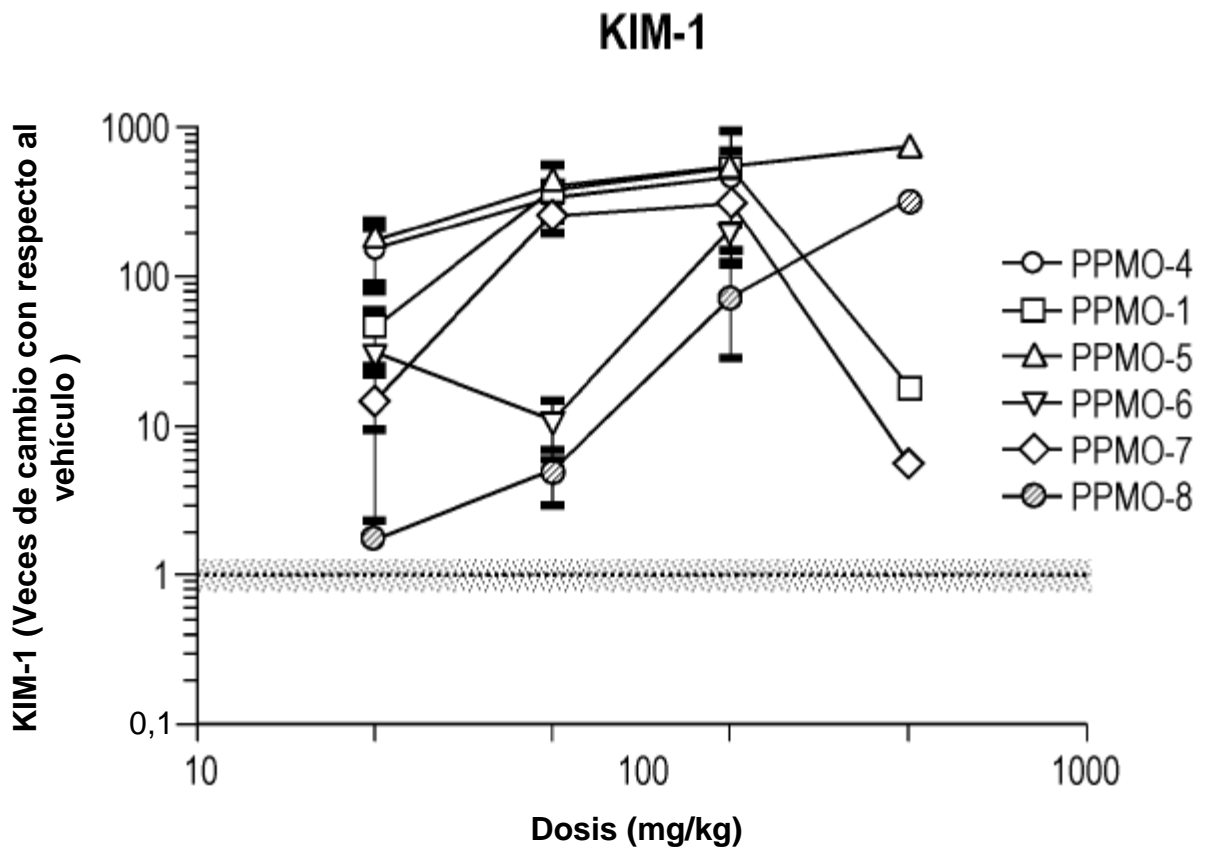


Figura 9

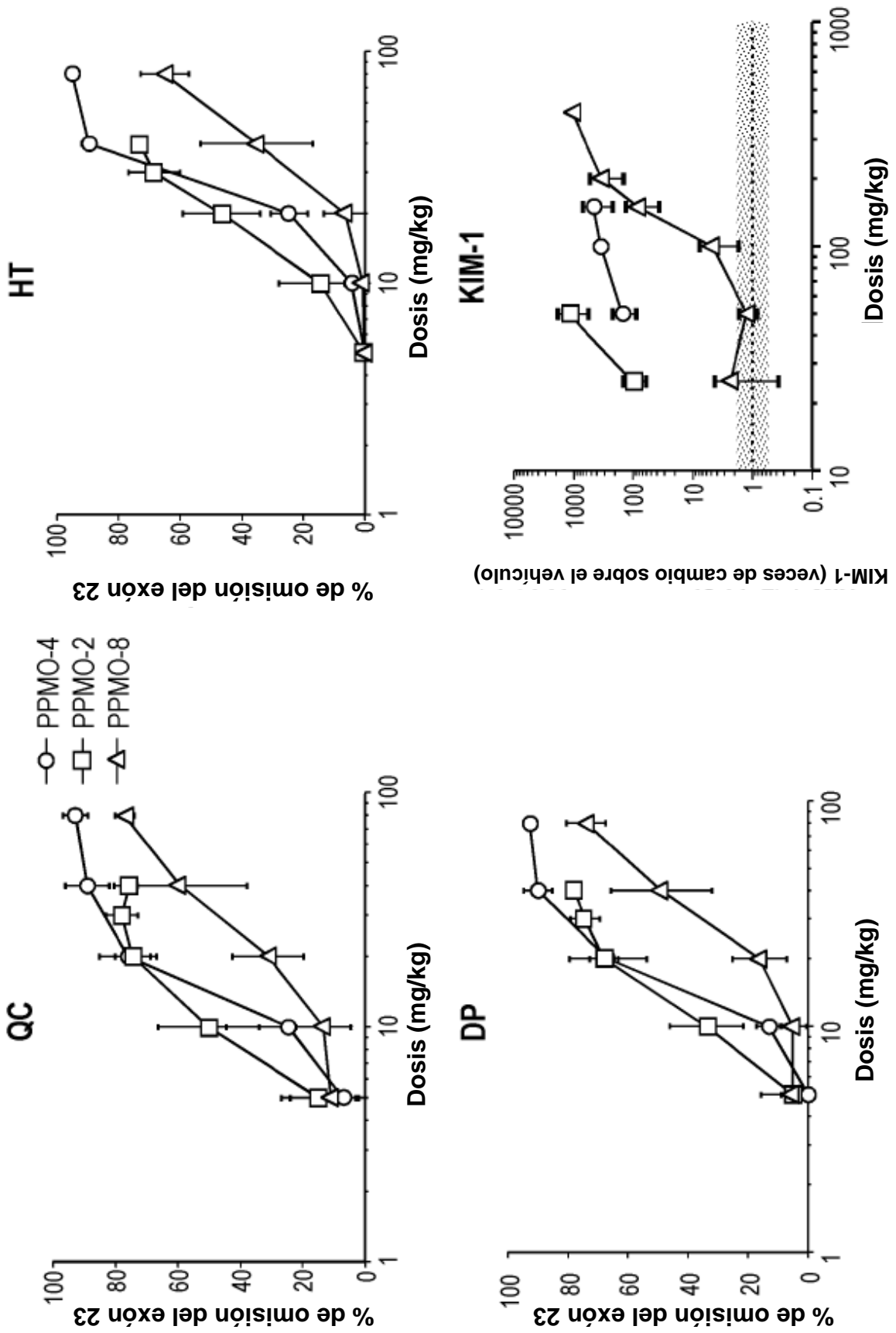


Figura 10