

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 027 057**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2015** E 19208809 (4)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.04.2025** EP 3660154

54 Título: **Ácido nucleico antisentido para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne**

30 Prioridad:

17.06.2014 JP 2014124157

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

12.06.2025

73 Titular/es:

**NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (50.00%)
14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho Minami-ku
Kyoto-shi
Kyoto 601-8550, JP y
NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND
PSYCHIATRY (50.00%)**

72 Inventor/es:

**WATANABE, NAOKI;
TONE, YUUICHIROU;
TAKEDA, SHIN'ICHI y
NAGATA, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 3 027 057 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

Ácido nucleico antisentido para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un oligóm antisentido que provoca la omisión de exones, que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a dos o más secuencias diferentes en un exón diana. Más específicamente, la presente invención se refiere a un oligómero antisentido que causa la omisión del exón 10 44 en el gen de la distrofina humana, y a una composición farmacéutica que comprende el oligómero. La invención se define en las reivindicaciones.

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más frecuente de distrofia muscular progresiva hereditaria que afecta a uno de cada aproximadamente 3.500 niños recién nacidos. Aunque las funciones 15 motoras rara vez son diferentes entre los seres humanos sanos en la infancia y la niñez, se observa debilidad muscular en niños de alrededor de 4 a 5 años. Después, la debilidad muscular progresa a pérdida de la deambulación aproximadamente a los 12 años y muerte debida a insuficiencia cardíaca o respiratoria en torno a los veinte años. La DMD es un trastorno grave. En la actualidad, no se encuentra disponible una terapia eficaz para la DMD, y se ha deseado fuertemente desarrollar un nuevo agente terapéutico.

Se sabe que la DMD está causada por una mutación en el gen de la distrofina. El gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X y es un gen enorme que consiste en 2,2 millones de pares de nucleótidos de ADN. El ADN se transcribe a precursores de ARNm, y los intrones se eliminan mediante corte y empalme 20 para sintetizar un ARNm de 13.993 bases, en el que se unen 79 exones. Este ARNm se traduce a 3.685 aminoácidos para producir la proteína distrofina. La proteína distrofina está asociada con el mantenimiento de la estabilidad de la membrana en las células musculares y es necesaria para que las células musculares sean menos frágiles. El gen de la distrofina de pacientes con DMD contiene una mutación y, por lo tanto, la proteína distrofina, que es funcional en las células musculares, rara vez se expresa. Por lo tanto, la estructura de las células musculares no se puede mantener en el organismo de los pacientes con DMD, lo que provoca 25 una gran afluencia de iones calcio a las células musculares. En consecuencia, se produce una respuesta similar a la inflamación para promover la fibrosis, de modo que las células musculares solamente pueden regenerarse con dificultad.

La distrofia muscular de Becker (BMD) también es causada por una mutación en el gen de la distrofina. Los 35 síntomas implican debilidad muscular, pero generalmente con un progreso leve y lento de la debilidad muscular, en comparación con la DMD. En muchos casos, su inicio es en la edad adulta. Se considera que las diferencias en los síntomas clínicos entre DMD y BMD residen en si el marco de lectura para los aminoácidos en la traducción del ARNm de distrofina a la proteína distrofina se ve alterado por la mutación o no (Documento Relacionado con Patentes 1). Más específicamente, en la DMD, la presencia de mutación desplaza el marco de lectura de aminoácidos para que se anule la expresión de la proteína distrofina 40 funcional, mientras que en la BMD la proteína distrofina que funciona, aunque de manera imperfecta, se produce porque el marco de lectura de aminoácidos se conserva, mientras que una parte de los exones son eliminados por la mutación.

Se espera que la omisión del exón sirva como método para el tratamiento de la DMD. Este método implica la 45 modificación del empalme para restaurar el marco de lectura de aminoácidos del ARNm de distrofina e inducir la expresión de la proteína distrofina que tiene la función parcialmente restaurada (Documento No Relacionado con Patentes 2). La parte de la secuencia de aminoácidos, que es una diana para la omisión del exón, se perderá. Por esta razón, la proteína distrofina expresada por este tratamiento se vuelve más corta de la normal, pero como se mantiene el marco de lectura de aminoácidos, la función para estabilizar las 50 células musculares se conserva parcialmente. En consecuencia, se espera que la omisión del exón conduzca una DMD a síntomas similares a los de la BMD, que es más leve. El enfoque de omisión de exones ha pasado los ensayos con animales utilizando ratones o perros y en la actualidad se evalúa en ensayos clínicos en pacientes con DMD humana.

La omisión de un exón puede ser inducida por la unión de ácidos nucleicos antisentido dirigidos al sitio de empalme 5' o 3' o ambos sitios, o sitios internos del exón. Un exón solo se incluirá en el ARNm cuando 55 ambos sitios de empalme del mismo sean reconocidos por el complejo de corte y empalme. Por lo tanto, la omisión del exón se puede inducir localizando los sitios de empalme con ácidos nucleicos antisentido. Además, la unión de una proteína SR, que es rica en serina y arginina, a un potenciador de corte y empalme exónico (ESE) se considera necesaria para que un exón sea reconocido por el mecanismo de corte y empalme. En consecuencia, la omisión del exón también se puede inducir eligiendo como diana el ESE.

Dado que una mutación del gen de la distrofina puede variar dependiendo de los pacientes con DMD, los 65 ácidos nucleicos antisentido deben diseñarse en función del sitio o tipo de mutación genética respectiva. Existen numerosos ácidos nucleicos antisentido que inducen la omisión de exones con una secuencia

consecutiva como diana para un único exón en el gen de la distrofina (Documentos de patente 1 a 6 y Documentos no de patente 1 y 2). Asimismo, se ha informado de que cuando dos tipos de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen al mismo exón del gen de la distrofina se mezclan y se dejan actuar (direccionamiento doble), la actividad de omisión se puede potenciar en comparación con el uso de cada ácido nucleico antisentido solo (Documento Relacionado con Patentes 7).

Sin embargo, ninguno de los informes previos muestra que un ácido nucleico antisentido de hebra sencilla conectado (de tipo conectado) que se dirija a dos o más sitios en el mismo exón, muestre actividad de omisión del exón (Documento Relacionado con Patentes 1).

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patentes

Documento de patente 1: Publicación Internacional WO 2004/048570

Documento de patente 2: Publicación Internacional WO 2009/139630

Documento de patente 3: Publicación Internacional WO 2010/048586

Documento de patente 4: US 2010/0168212

Documento de patente 5: Publicación Internacional WO 2011/057350

Documento de patente 6: Publicación Internacional WO 2006/000057

Documento de patente 7: Publicación Internacional WO 2007/135105

Documentos no de patente

Documentos no de patente 1: Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77

Documentos no de patente 2: Wilton S. D. et al., Molecular Therapy 2007: 15: pág. 1288-96

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

En estas circunstancias, un objeto principal de la presente invención es proporcionar un oligómero antisentido de tipo conectado novedoso que induzca la omisión de exones mediante el direccionamiento de dos secuencias de nucleótidos diferentes en el mismo exón en el gen de la distrofina y un agente terapéutico para la distrofia muscular que comprenda el oligómero.

Medios de resolver el problema

Los autores de la presente invención han llevado a cabo estudios exhaustivos sobre el contenido de las técnicas descritas en los documentos descritos anteriormente y la estructura del gen de la distrofina, etc., y en consecuencia han descubierto que un oligómero antisentido obtenido conectando oligómeros que se dirigen a dos sitios diferentes en el exón 44 del gen de la distrofina humana puede inducir la omisión de este exón. Basándose en este hallazgo, los autores de la presente invención han completado la presente descripción.

Es decir, la presente descripción es como sigue.

[1] Un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases en donde se conectan

(a) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en un exón diana; y

(b) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el exón diana, en donde

la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se solapan entre sí, y

el oligómero antisentido induce la omisión del exón diana, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

5 [2] El oligómero antisentido según el apartado [1] anterior, en donde el primer y/o segundo oligómeros unitarios comprenden una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos parcial de un intrón adyacente al exón diana, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

10 [3] El oligómero antisentido de acuerdo con los apartados [1] y [2], en donde el exón diana es un exón en el gen de la distrofina humana, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

[4] El oligómero antisentido de acuerdo con el apartado [1] o [2], en donde la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada entre la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

15 [5] El oligómero antisentido según uno cualquiera de los apartados [1] a [3], en donde la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada entre la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

20 [6] El oligómero antisentido según los apartados [1] o [2], en donde los dos oligómeros unitarios seleccionados del grupo que consiste en los siguientes apartados (c) a (e) están conectados:

25 (c) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada entre la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 3;

30 (d) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada entre la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 4; y

(e) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada entre la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 5, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

35 [7] El oligómero antisentido según los apartados [1] y [2], que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6 a 9, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

40 [8] El oligómero antisentido según uno cualquiera de los apartados [1] a [7], que es un oligonucleótido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

45 [9] El oligómero antisentido según el apartado [8], en donde el radical azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido están modificados, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

50 [10] El oligómero antisentido según los apartados [8] o [9], en donde el radical azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo 2'-OH se ha remplazado por uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br e I (en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquilenilo), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

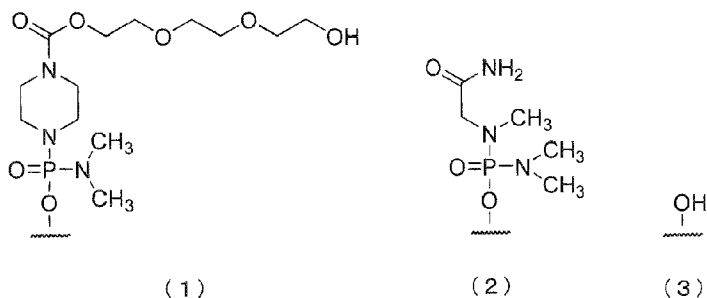
55 [11] El oligómero antisentido según uno cualquiera de los apartados [8] a [10], en donde la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace boranofosfato, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

[12] El oligómero antisentido según uno cualquiera de los apartados [1] a [7], que es un oligómero de morfolino, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

60 [13] El oligómero antisentido según la reivindicación [12], que es un oligómero de morfolino, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

65 [14] El oligómero antisentido según los apartados [12] o [13], en donde el extremo 5' es una cualquiera de las fórmulas químicas (1) a (3) siguientes, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

[Formula 1]



5 [15] Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como ingrediente activo el oligómero antisentido según uno cualquiera de los apartados [1] a [14], o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

10 [16] La composición farmacéutica según el apartado [15], que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

15 [17] Un método de tratamiento de la distrofia muscular, que comprende proporcionar a un paciente con distrofia muscular el oligómero antisentido o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo según uno cualquiera de los apartados [1] a [12] o la composición farmacéutica según los apartados [1] a [16].

20 [18] El método para el tratamiento según el apartado [17], en donde el paciente con distrofia muscular tiene una o varias mutaciones que van a ser elegidas como diana para la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina.

[19] El método para el tratamiento según los apartados [17] o [18], en donde el paciente es un ser humano.

25 [20] El uso del oligómero antisentido o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo según uno cualquiera de los apartados [1] a [14] en la fabricación de la composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular.

[21] El oligómero antisentido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo según uno cualquiera de los apartados [1] a [14], que se aplica para el tratamiento de la distrofia muscular.

30 [22] El oligómero antisentido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo según el apartado [21], en donde el paciente con distrofia muscular en dicho tratamiento tiene una o varias mutaciones que se van a elegir como diana para la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina.

35 [23] El oligómero antisentido según los apartados [21] o [22], o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo, en donde el paciente es un ser humano.

[24] Un método para la fabricación del oligómero antisentido según el apartado [1], que comprende conectar

40 (a) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en un exón diana; y

45 (b) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el exón diana para producir un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases, en donde la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se solapan entre sí.

50 [25] El método según el apartado [24], que comprende adicionalmente:

medir la eficacia de omisión por el oligómero antisentido obtenido; y

seleccionar un oligómero antisentido que tenga la eficacia de omisión que exceda un valor de referencia.

55

[26] Un método de escrutinio de un oligómero antisentido, que comprende:

(a) seleccionar

5 (i) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en un exón diana; y

10 (ii) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el exón diana, en donde la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se solapan entre sí;

15 (b) conectar el primer y segundo oligómeros unitarios para producir un oligómero antisentido que tenga una longitud de 15 a 30 bases;

(c) medir la eficacia de omisión por el oligómero antisentido obtenido en la etapa (b); y

20 (d) seleccionar un oligómero antisentido que tenga una eficacia de omisión que exceda un valor de referencia.

Efectos de la invención

25 El oligómero antisentido de la presente invención puede inducir la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana con una elevada eficacia. Asimismo, los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne se pueden aliviar de manera eficaz administrando la composición farmacéutica de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

30 La FIG. 1 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

35 La FIG. 2 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

La FIG. 3 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

40 La FIG. 4 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

La FIG. 5 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

45 La FIG. 6 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

50 La FIG. 7 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

La FIG. 8 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

55 La FIG. 9 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

La FIG. 10 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

60 La FIG. 11 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

65 La FIG. 12 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rhabdomioma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.

- La FIG. 13 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 5 La FIG. 14 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- La FIG. 15 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 10 La FIG. 16 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- La FIG. 17 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 15 La FIG. 18 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- La FIG. 19 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 20 La FIG. 20 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- La FIG. 21 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 25 La FIG. 22 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 30 La FIG. 23 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- La FIG. 24 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 35 La FIG. 25 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- La FIG. 26 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las respectivas concentraciones de los oligómeros.
- 40 La FIG. 27 muestra una comparación de la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) entre una forma conectada y una mezcla de dos oligómeros unitarios que se dirigen a diferentes sitios.
- 45 La FIG. 28 muestra una comparación de la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) entre una forma conectada y una mezcla de dos oligómeros unitarios que se dirigen a diferentes sitios.
- 50 La FIG. 29 muestra una comparación de la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) entre una forma conectada y una mezcla de dos oligómeros unitarios que se dirigen a diferentes sitios.
- La FIG. 30 muestra una comparación de la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) entre una forma conectada y una mezcla de dos oligómeros unitarios que se dirigen a diferentes sitios.
- 55 La FIG. 31 muestra una comparación de la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) entre una forma conectada y una mezcla de dos oligómeros unitarios que se dirigen a diferentes sitios.
- 60 La FIG. 32 muestra la eficacia de la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana en fibroblastos de un paciente con DMD humano con delección del exón 45.
- 65

Modo de llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle. Las realizaciones descritas a continuación están destinadas a presentarse a modo de ejemplo simplemente para describir la invención, pero no se limitan solamente a las siguientes realizaciones. Las referencias a los métodos de tratamiento de esta descripción deben interpretarse como referencias a compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en esos métodos.

La invención se define en las reivindicaciones:

1. Oligómero antisentido

La presente invención proporciona el oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases en donde se conectan

(a) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en un Exón 44 en un gen de el gen diana; y

(b) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases en el Exon 44 consecutivas están conectadas, en donde la primera oligómero unitario está posicionada en el lado 3' de la segunda oligómero unitario,

en donde la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de de 7 a 15 bases consecutivas seleccionadas de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionadas de la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 2,

o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma con la condición de que están excluidos los oligómeros antisentido que consisten en una cualquiera de una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que consiste en SEQ ID Nos: 6, 7, 8 y 9.

En lo sucesivo, "un oligómero antisentido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo" se puede denominar genéricamente "oligómero antisentido" colectivamente.

El oligómero antisentido descrito anteriormente se puede elaborar mediante un método de elaboración que comprende conectar

(a) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en un exón diana; y

(b) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el exón diana

para producir un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases, en donde

la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se solapan entre sí.

El método para la elaboración puede comprender adicionalmente la etapa de medir la eficacia de la omisión por el oligómero antisentido obtenido, y una etapa secundaria de selección del oligómero antisentido que tiene una eficacia de omisión que excede un valor de referencia.

En la etapa secundaria del método de elaboración descrito anteriormente, la eficacia de omisión se puede determinar como sigue. Se recoge el ARNm para el gen que comprende el exón elegido como diana de las células de ensayo; en el ARNm, se miden el nivel de polinucleótido "A" de la banda en la que se omite el exón diana y el nivel de polinucleótido "B" de la banda en la que no se omite el exón diana. Utilizando estos valores de medición de "A" y "B", se calcula la eficacia mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia de omisión (\%)} = A/(A + B) \times 100$$

Alternativamente, para el cálculo de la eficacia de omisión, se puede hacer referencia a la Publicación Internacional WO2012/029986.

En la etapa secundaria, la eficacia de omisión utilizada como valor de referencia es de 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más o 90% o más.

Al conectar una pluralidad de oligómeros unitarios como se ha mencionado anteriormente, se puede obtener un oligómero antisentido que tenga una mejor actividad de omisión incluso si cada uno de los oligómeros unitarios tiene una baja actividad de omisión (o sin actividad de omisión).

5 La presente descripción también proporciona un método para escrutar un oligómero antisentido, que comprende:

(a) seleccionar

10 (i) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en un exón diana; y

(ii) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el exón diana, en donde

15 la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se solapan entre sí;

20 (b) conectar el primer y segundo oligómeros unitarios para producir un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases;

(c) medir la eficacia de omisión por el oligómero antisentido obtenido en la etapa (b); y

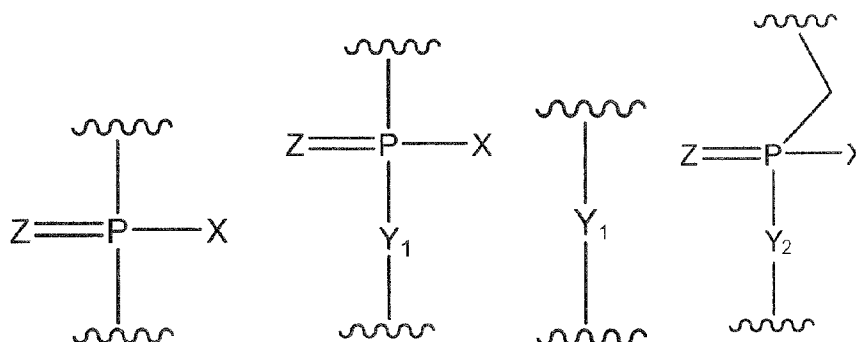
25 (d) seleccionar un oligómero antisentido que tiene una eficacia de omisión que excede un valor de referencia.

En el oligómero antisentido descrito anteriormente, el primer y segundo oligómeros unitarios se pueden conectar de manera que uno cualquiera del primer y segundo oligómeros unitarios esté situado en el lado 5' o 3' del otro. En una realización, el primer oligómero unitario está situado en el lado 5', y el segundo oligómero unitario está situado en el lado 3' para la conexión.

35 Asimismo, el oligómero antisentido puede comprender un tercer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una tercera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el exón diana.

40 Como se emplea en la presente memoria, el término "conectar", se refiere a uno en el que los dos oligómeros unitarios están unidos directamente entre sí, o a uno en el que los dos oligómeros unitarios están unidos entre sí a través de un conector. Cuando los dos oligómeros unitarios se unen directamente entre sí, el extremo 3' del oligómero unitario situado en el lado 5' y el extremo 5' del otro oligómero unitario situado en el lado 3' forman un enlace fosfato o un grupo mostrado más abajo. Los ejemplos del conector incluyen un ácido nucleico (cadena) de 1 a 5 residuos, así como un conector conocido normalmente utilizado para conectar ácidos nucleicos o derivados morfolino de ácidos nucleicos, tales como 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-ditanosulfonilo y alquilamino de cadena larga (LCAA).

45 [Fórmula 2]



50 en donde X representa -OH, -CH₂R¹, -O-CH₂R¹, -S-CH₂R¹, -NR₂R³ o F;

R¹ representa H o un alquilo;

R² y R³, que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno H, un alquilo, un cicloalquilo o un arilo;

55

Y₁ representa O, S, CH₂ o NR¹;

Y₂ representa O, S o NR¹;

5 Z representa O o S.

10 El primer y/o segundo oligómeros unitarios pueden comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos parcial de un intrón adyacente al exón diana. En una realización en la que, por ejemplo, el primer y segundo oligómeros unitarios se conectan entre sí de manera que cuando el primer oligómero unitario está situado en el lado 5' y el segundo oligómero unitario está situado en el lado 3', el lado 5' del primer oligómero unitario puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que reside en las proximidades del extremo 3' de un intrón adyacente en el lado 5' del exón diana, y/o el lado 3' del segundo oligómero unitario puede comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos que reside en las proximidades del extremo 5' de un intrón adyacente en el lado 3' del exón diana.

15 El primer y/o segundo oligómeros unitarios pueden comprender una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos parcial de un potenciador de corte y empalme exónico (ESE) del exón diana.

20 El exón diana no está particularmente limitado. En una realización, el exón diana es un exón en un gen humano y es adicionalmente un exón en un gen de distrofina humana.

25 Más específicamente, el exón diana es el exón 44 en el gen de distrofina humana.

30 Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un oligómero antisentido que ocasiona la omisión del exón 44 en el gen de distrofina humana (en lo sucesivo, referido como "el oligómero de la presente invención"). En lo sucesivo, la estructura del oligómero antisentido de la presente invención se describirá con detalle.

[Exón 44 en el gen de distrofina humana]

35 En la presente invención, se pretende que el término "gen" signifique un gen genómico y también incluya ADNc, precursor de ARNm y ARNm. Preferiblemente, el gen es precursor de ARNm, es decir, pre-ARNm.

40 En el genoma humano, el gen de distrofina humana se localiza en el locus Xp21.2. El gen de la distrofina humana tiene un tamaño de 3,0 Mpb y es el gen más grande entre los genes humanos conocidos. Sin embargo, las regiones codificantes del gen de la distrofina humana tienen solo 14 kb, distribuidas en forma de 79 exones en todo el gen de la distrofina humana (Roberts, RG., et al., Genomics, 16:536-538 (1993)). El pre-ARNm, que es el transcrito del gen de la distrofina humana, se empalma para generar ARNm maduro de 14 kb. Se conoce la secuencia de nucleótidos del gen de la distrofina de tipo salvaje humana (Núm. de Acceso GenBank NM_004006).

45 La secuencia de nucleótidos del exón 44 en el gen de la distrofina de tipo salvaje humana está representada por SEQ ID NO: 10.

50 En una realización, el oligómero de la presente invención está diseñado para provocar la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana, modificando de ese modo la proteína codificada por el tipo DMD del gen de la distrofina al tipo BMD de la proteína distrofina. Por consiguiente, el exón 44 en el gen de la distrofina que es la diana de la omisión del exón por el oligómero antisentido de la presente invención incluye los tipos tanto salvajes como mutantes.

55 Específicamente, los mutantes del exón 44 del gen de la distrofina humana incluyen los polinucleótidos definidos en (I) o (II) a continuación.

(I) Un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10; y,

60 (II) Un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10.

Como se emplea en la presente memoria, se pretende que el término "polinucleótido" signifique ADN o ARN.

65 Como se emplea en la presente memoria, el término "polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas" se refiere, por ejemplo, a un polinucleótido obtenido por hibridación de colonias, hibridación de placa, hibridación Southern o similar, utilizando como sonda todo o parte de un polinucleótido que consiste en una secuencia de

nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos, p. ej., de SEQ ID NO: 10. El método de hibridación que se puede utilizar incluye los métodos descritos, por ejemplo, por "Sambrook & Russell, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," etc.

5

Como se emplea en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos complementaria" no se limita solo a secuencias de nucleótidos que forman pares de Watson-Crick con secuencias de nucleótidos diana, sino que también se pretende que incluya secuencias de nucleótidos que forman pares de bases Wobble. Como se emplea en la presente memoria, el término par de Watson-Crick se refiere a un par de nucleobases en el que se forman enlaces de hidrógeno entre adenina-timina, adenina-uracilo o guanina-citosina, y el término par de bases Wobble se refiere a un par de nucleobases en el que se forman enlaces de hidrógeno entre guanina-uracilo, inosina-uracilo, inosina-adenina o inosina-citosina. Como se emplea en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos complementaria" no solo se refiere a una secuencia de nucleótidos 100% complementaria a la secuencia de nucleótidos diana, sino que también se refiere a una secuencia de nucleótidos complementaria que puede contener, por ejemplo, de 1 a 3, 1 o 2, o un nucleótido no complementario a la secuencia de nucleótidos diana.

10

15

Como se emplea en la presente memoria, el término "condiciones rigurosas" puede ser cualquiera de las condiciones de baja rigurosidad, condiciones de moderada rigurosidad o condiciones de alta rigurosidad. El término "condiciones de baja rigurosidad" consiste, por ejemplo, en 5x SSC, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% a 32°C. El término "condiciones rigurosas moderadas" consiste, por ejemplo, en 5x SSC, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% a 42°C, o 5x SSC, SDS al 1%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 50 % de formamida a 42°C. El término "condiciones altamente rigurosas" consiste, por ejemplo, en 5x SSC, 5x solución de Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% a 50°C o 0,2 x SSC, SDS al 0,1% a 65°C. En estas condiciones, se espera que los polinucleótidos con mayor homología se obtengan de manera eficaz a temperaturas más altas, aunque están implicados múltiples factores en la rigurosidad de la hibridación, incluyendo la temperatura, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, la fuerza iónica, el tiempo, la concentración de sal y otros, y los expertos en la técnica pueden seleccionar adecuadamente estos factores para lograr una rigurosidad similar.

20

25

30

Cuando se utilizan kits disponibles comercialmente para la hibridación, por ejemplo, se puede utilizar un Sistema de Detección y Marcaje Directo Alkphos (GE Healthcare). En este caso, según el protocolo adjunto, después del cultivo con una sonda marcada durante la noche, la membrana se lava con un tampón de lavado primario que contiene SDS al 0,1% (p/v) a 55°C, detectando así los polinucleótidos hibridados. Alternativamente, al producir una sonda basada en la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10, se puede detectar la hibridación con un kit de detección de ácido nucleico DIG (Roche Diagnostics) cuando la sonda se marca con digoxigenina (DIG) utilizando un reactivo disponible comercialmente (p. ej., una Mezcla de Marcaje de PCR (Roche Diagnostics), etc.).

35

40

Además de los polinucleótidos descritos anteriormente, otros polinucleótidos que se pueden hibridar incluyen polinucleótidos que tienen 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, 99,1% o más, 99,2% o más, 99,3% o más, 99,4% o más, 99,5% o más, 99,6% o más, 99,7% o más, 99,8% o más o 99,9% o más identidad con el polinucleótido de SEQ ID NO: 10, según lo calculado por el soporte lógico de búsqueda de homología BLAST utilizando los parámetros por defecto.

45

La identidad entre las secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el algoritmo BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica) de Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873, 1993). Se han desarrollado programas llamados BLASTN y BLASTX basados en el algoritmo BLAST (Altschul SF, et al.: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Cuando se secuencia una secuencia de nucleótidos utilizando BLASTN, los parámetros son, por ejemplo, puntuación = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se emplean los parámetros por defecto para cada programa.

50

55

El oligómero de la presente descripción es específicamente un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases en donde se conectan dos oligómeros unitarios seleccionados del grupo que consiste en los siguientes apartados (a) y (b):

60

(a) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1, y

65

(b) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2.

Por ejemplo, la primera secuencia de nucleótidos puede ser una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1, y/o la segunda secuencia de nucleótidos puede ser una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2.

5

Preferiblemente, el oligómero de la presente divulgación es un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases en el que los dos oligómeros unitarios seleccionados del grupo que consiste en los siguientes apartados (c) a (e) están conectados:

10

(c) un oligómero unitario que consiste en una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 3;

15

(d) un oligómero unitario que consiste en una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 4; y

20

(e) un oligómero unitario que consiste en una secuencia complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 5.

25

En la presente memoria, las secuencias de nucleótidos representadas por SEQ ID NO: 1 y 2 son las secuencias que consisten en la 1^a a la 44^a bases y la 58^a a la 115^a bases, respectivamente, desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del exón 44 (SEQ ID NO: 10) en el gen de distrofina de tipo salvaje humana.

30

La secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 3 es la secuencia que consiste en la 18^a a la 34^a bases desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del exón 44 (SEQ ID NO: 10) en el gen de distrofina de tipo salvaje humana. De un modo similar, las secuencias de nucleótidos representadas por SEQ ID NO: 4 y 5 son las secuencias que consisten en la 61^a a la 77^a bases y la 88^a a la 104^a bases, respectivamente.

35

El tamaño de cada uno de los oligómeros unitarios (a) a (e) (en lo sucesivo, también referidos simplemente como "las unidades") tiene una longitud de 7 a 15 bases y tiene preferiblemente una longitud de 8 a 15 bases, una longitud de 9 a 15 bases, una longitud de 10 a 15 bases, una longitud de 10 a 14 bases, una longitud de 10 a 13 bases o una longitud de 11 a 13 bases. Las unidades (a) a (e) pueden tener el mismo tamaño o pueden tener tamaños diferentes.

40

Para seleccionar dos oligómeros unitarios del grupo que consiste en (a) y (b), los dos oligómeros unitarios pueden ser una combinación de los mismos oligómeros unitarios o puede ser una combinación de diferentes oligómeros unitarios. Específicamente, los dos oligómeros unitarios pueden ser una combinación de (a) y (a) o una combinación de (b) y (b) o pueden ser una combinación de (a) y (b).

45

Para seleccionar dos oligómeros unitarios del grupo que consiste en (c) a (e), los dos oligómeros unitarios pueden ser una combinación de los mismos oligómeros unitarios o pueden ser una combinación de diferentes oligómeros unitarios. Preferiblemente, las dos unidades se seleccionan respectivamente entre diferentes tipos. Cuando, por ejemplo, (c) se selecciona como una unidad, la otra unidad es preferiblemente (d) o (e). Del mismo modo, cuando (d) se selecciona como una unidad, la otra unidad es preferiblemente (c) o (e). Asimismo, cuando (e) se selecciona como una unidad, la otra unidad es preferiblemente (c) o (d).

50

Cuando se seleccionan las unidades (a) y (b), cualquiera de las dos unidades seleccionadas se puede localizar en el lado 5'. Cuando se seleccionan las unidades (a) y (b), la unidad (a) se conecta preferiblemente en el lado 3'.

55

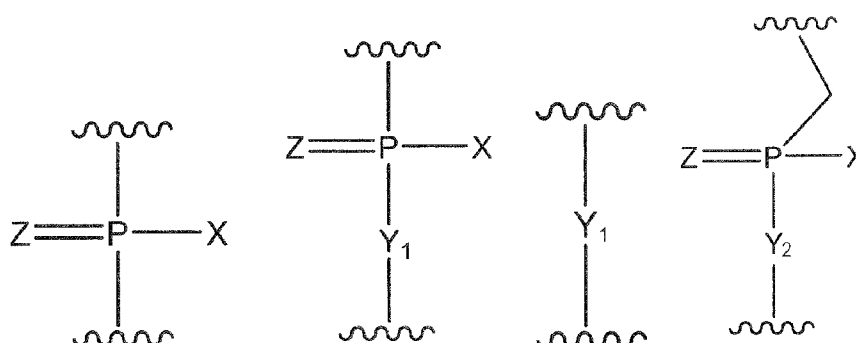
Cuando las dos unidades se seleccionan entre (c) a (e), cualquiera de las dos unidades seleccionadas puede estar localizada en el lado 5'. Cuando se seleccionan las unidades (c) y (d), la unidad (c) se conecta preferiblemente en el lado 3'. Cuando se seleccionan las unidades (d) y (e), la unidad (d) se conecta preferiblemente en el lado 3'. Cuando se seleccionan las unidades (c) y (e), la unidad (c) se conecta preferiblemente en el lado 3'.

60

Como se emplea en la presente memoria, el término "conectar" se refiere a la unión directa de dos unidades seleccionadas entre (a) y (b) o dos unidades seleccionadas entre (c) a (e). Específicamente, el término "cuando dos unidades se conectan" significa que el extremo 3' de la unidad situada en el lado 5' y el extremo 5' de la unidad situada en el lado 3', forman un enlace fosfato o un grupo mostrado más abajo.

65

[Fórmula 3]



en donde X representa -OH, -CH₂R¹, -O-CH₂R¹, -S-CH₂R¹, -NR₂R³ o F;

R¹ representa H o un alquilo;

R² y R³, que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno H, un alquilo, un cicloalquilo o un arilo;

Y₁ representa O, S, CH₂ o NR¹;

Y₂ representa O, S o NR¹;

Z representa O o S.

Se pretende que el término "causar omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana" signifique que mediante la unión del oligómero de la presente invención al sitio correspondiente al exón 44 del transcrito (p. ej., pre-ARN^m) del gen de la distrofina humana, por ejemplo, dé como resultado de ese modo la formación de ARNm maduro que está libre de desplazamiento del marco de codones, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 46 se corta y empalma a la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' del exón 43 en pacientes con DMD con delección del exón 45 cuando el transcrito experimenta corte y empalme.

En la presente memoria, se pretende que el término "unión" descrito anteriormente signifique que cuando el oligómero de la presente invención se mezcla con el transcrito del gen de la distrofina humana, ambos hibriden en condiciones fisiológicas para formar un ácido nucleico de doble hebra. El término "bajo condiciones fisiológicas" se refiere a las condiciones establecidas para imitar el entorno *in vivo* en términos de pH, composición de sal y temperatura. Las condiciones son, por ejemplo, 25 a 40°C, preferiblemente 37°C, pH de 5 a 8, preferiblemente pH 7,4 y concentración de cloruro de sodio 150 mM.

Si se ha ocasionado o no la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana se puede confirmar introduciendo el oligómero de la presente invención en una célula de expresión de distrofina (p. ej., células de rhabdomyosarcoma humano), amplificando la región que rodea el exón 44 del ARNm del gen de la distrofina humana del ARN total de la célula de expresión de la distrofina por medio de RT-PCR y realizando una PCR anidada o un análisis de secuencia en el producto amplificado por PCR.

La eficacia de la omisión se puede determinar de la siguiente manera. Se recoge el ARNm para el gen de la distrofina humana de las células de ensayo; en el ARNm, se mide el nivel de polinucleótido "A" de la banda donde se omite el exón 44 y se mide el nivel de polinucleótido "B" de la banda donde no se omite el exón 44. Utilizando estos valores de medición de "A" y "B", se calcula la eficacia mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Eficacia de omisión (\%)} = A/(A + B) \times 100$$

Alternativamente, para el cálculo de la eficacia de omisión, se puede hacer referencia a la Publicación Internacional WO2012/029986.

Preferiblemente, el oligómero antisentido de la presente invención que ocasiona la omisión del exón elegido como diana (p. ej., exón 44) con una eficacia de 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, o 90% o más.

El oligómero antisentido de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido, oligómero de morfolino o ácido péptido nucleico (PNA), que tiene una longitud de 15 a 30 bases. La longitud es preferiblemente de 16 a 30, de 17 a 30, de 18 a 30, de 19 a 30, de 20 a 30, de 20 a 29, de 20 a 28, de 20 a 27, de 20 a 26, de 21 a 26, o de 22 a 26 bases y se prefieren los oligómeros de morfolino.

El oligonucleótido descrito anteriormente (en lo sucesivo denominado "el oligonucleótido de la presente invención") es el oligómero de la presente invención compuesto por nucleótidos como unidades constituyentes. Tales nucleótidos pueden ser cualquiera de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados.

El nucleótido modificado se refiere a uno que tiene nucleobases, radicales azúcar y/o regiones de unión a fosfato modificados total o parcialmente, que constituyen el ribonucleótido o desoxirribonucleótido.

La nucleobase incluye, por ejemplo, adenina, guanina, hipoxantina, citosina, timina, uracilo y sus bases modificadas. Los ejemplos de tales nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, pseudouracilo, 3-metiluracilo, dihidouracilo, 5-alquilcitosinas (p. ej., 5-metilcitosina), 5-alquiluracilos (p. ej., 5-etiluracilo), 5-halouracilos (5-bromouracilo), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidinas (6-metiluracilo), 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, 1-metiladenina, 1-metilhipoxantina, 2,2-dimetilguanina, 3-metilcitosina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5-metilaminometiluracilo, 5-metilcarbonilmetiluracilo, 5-metiloxiuracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, 2-tiocitosina, purina, 2,6-diaminopurina 2-aminopurina, isoguanina, indol, imidazol, xantina, etc.

La modificación del radical azúcar puede incluir, por ejemplo, modificaciones en la posición 2' de la ribosa y modificaciones de las otras posiciones del azúcar. La modificación en la posición 2' de la ribosa incluye el reemplazo del 2'-OH de la ribosa por OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br o I, en donde R representa un alquilo o un arilo y R' representa un alquileo.

La modificación para las otras posiciones del azúcar incluye, por ejemplo, el reemplazo de O en la posición 4' de la ribosa o desoxirribosa por S, formando puentes entre las posiciones 2' y 4' del azúcar, p. ej., ENA (Ácido Nucleico Bloqueado) o ENA (ácidos nucleicos con puentes de etileno 2'-O,4'-C), pero no se limita a los mismos.

Una modificación de la región de unión a fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de reemplazo del enlace fosfodiéster por un enlace fosforitoato, un enlace fosfordiitoato, un enlace alquifosfonato, un enlace fosfoamidato o un enlace boranofosfato (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (véase, p. ej., Re-Publicaciones Nacionales Japonesas de las Solicitudes PCT Núm. 2006/129594 y 2006/038608).

El alquilo es preferiblemente un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *terc*-pentilo, *n*-hexilo e isohexilo. El alquilo puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos de tales sustituyentes son un halógeno, un alcoxi, ciano y nitro. El alquilo puede estar sustituido con uno a tres de tales sustituyentes.

El cicloalquilo es preferiblemente un cicloalquilo que tiene de 5 a 12 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo y ciclododecilo.

El halógeno incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

El alcoxi es un alcoxi lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, tal como metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, *n*-pentiloxi, isopentiloxi, *n*-hexiloxi, isohexiloxi, etc. Entre otros, se prefiere un alcoxi que tiene de 1 a 3 átomos de carbono.

El arilo es preferiblemente un arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen fenilo, α -naftilo y β -naftilo. Entre otros, se prefiere fenilo. El arilo puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos de tales sustituyentes son un alquilo, un halógeno, un alcoxi, ciano y nitro. El arilo puede estar sustituido con uno a tres de tales sustituyentes.

En esta invención el alquileo es preferiblemente un alquileo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen metileno, etileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno, 2-(etil)trimetileno y 1-(metil)tetrametileno.

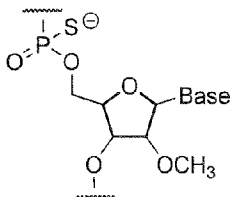
El acilo incluye un alcanilo o aroilo lineales o ramificados. Los ejemplos del alcanilo incluyen formilo, acetilo, 2-metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, etc. Los ejemplos del aroilo incluyen benzoilo, toluoilo y naftoilo. El aroilo puede estar opcionalmente sustituido en posiciones sustituibles y puede estar sustituido con uno o más alquilos.

5

Preferiblemente, el oligonucleótido de la presente invención es el oligómero de la presente invención que contiene una unidad constitutiva representada por la fórmula general de más abajo en donde el grupo -OH en la posición 2' de la ribosa está sustituido con metoxi y la región de unión a fosfato es un enlace fosforotioato:

10

[Fórmula 4]



en donde Base representa una nucleobase.

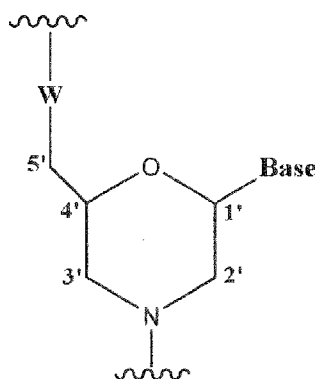
15

El oligonucleótido de la presente invención puede sintetizarse fácilmente utilizando diversos sintetizadores automáticos (p. ej., AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). Alternativamente, la síntesis también se le puede confiar a una organización externa (p. ej., Promega Inc., o Takara Co.), etc.

20

El oligómero de morfolino descrito anteriormente es el oligómero de la presente invención que comprende la unidad constitutiva representada por la siguiente fórmula general:

[Fórmula 5]



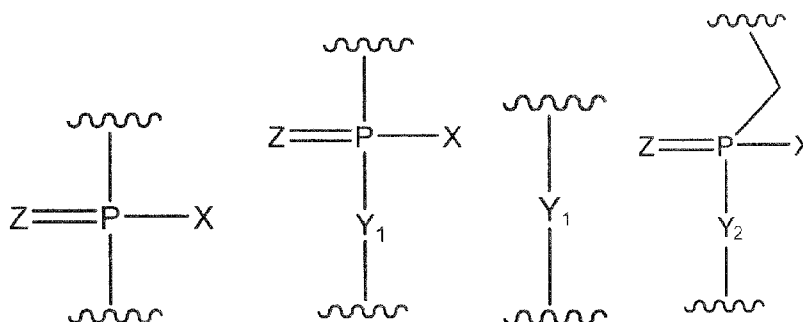
25

en donde Base tiene el mismo significado definido anteriormente, y

W representa un grupo mostrado por cualquiera de los siguientes grupos:

30

[Fórmula 6]



35

en donde X representa $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}_2\text{R}^3$ o F;

R^1 representa H o un alquilo;

R² y R³, que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno H, un alquilo, un cicloalquilo o un arilo;

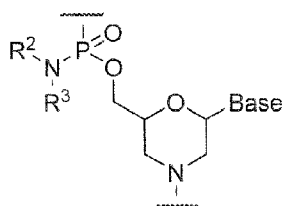
5 Y₁ representa O, S, CH₂ o NR¹;

Y₂ representa O, S o NR¹;

10 Z representa O o S.

Preferiblemente, el oligómero de morfolino es un oligómero que comprende una unidad constitutiva representada por la siguiente fórmula general (oligómero de morfolino de fosfordiamidato (en lo sucesivo denominado "PMO")).

15 [Fórmula 7]



20 en donde Base, R² y R³ tienen el mismo significado definido anteriormente.

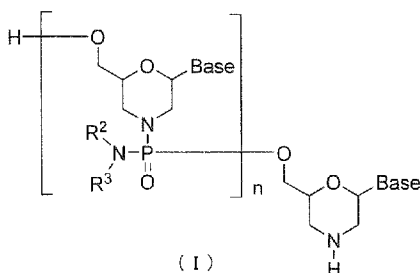
20

El oligómero de morfolino se puede producir de acuerdo, p. ej., con los documentos WO 1991/009033 o WO 2009/064471. En particular, se puede producir PMO mediante el procedimiento descrito en el documento WO 2009/064471 o WO2013/100190.

25 [Método para producir PMO]

Una realización de PMO es, por ejemplo, el compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) (en adelante PMO (I)).

30 [Fórmula 8]



35 en donde Base, R² y R³ tienen el mismo significado definido anteriormente; y,

35

n es un número entero dado de 1 a 99, preferiblemente un número entero dado de 18 a 28.

El PMO (I) se puede producir de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, se puede producir llevando a cabo los procedimientos en las siguientes etapas.

40

Los compuestos y reactivos utilizados en las siguientes etapas no están particularmente limitados siempre que se utilicen comúnmente para preparar PMO.

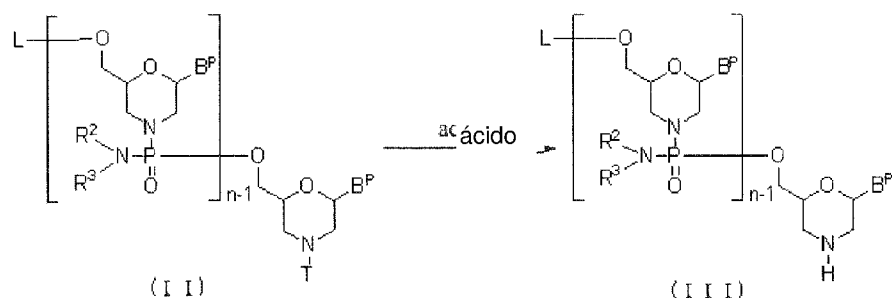
45

Asimismo, las siguientes etapas se pueden llevar a cabo mediante el método en fase líquida o el método en fase sólida (utilizando sintetizadores manuales o automáticos en fase sólida disponibles comercialmente). Al producir PMO por el método en fase sólida, se desea utilizar sintetizadores automáticos a la luz de procedimientos de operación simples y síntesis precisas.

(1) Etapa A:

El compuesto representado por la siguiente fórmula general (II) (en adelante denominado Compuesto (II)) se hace reaccionar con un ácido para preparar el compuesto representado por la siguiente fórmula general (III) (en adelante denominado Compuesto (III)):

[Fórmula 9]



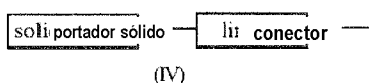
en donde n, R² y R³ tener el mismo significado definido anteriormente;

cada B^P representa independientemente una nucleobase que puede estar opcionalmente protegida;

T representa tritilo, monometoxitritilo o dimetoxitritilo; y,

L representa hidrógeno, un acilo o un grupo representado por la siguiente fórmula general (IV) (en lo sucesivo denominado grupo (IV)).

[Fórmula 10]



La "nucleobase" para B^P incluye la misma "nucleobase" que en Base, siempre que el grupo amino o hidroxilo de la nucleobase que muestra B^P puede estar protegido

Tal grupo protector de amino no está particularmente limitado siempre que se utilice como grupo protector para ácidos nucleicos. Los ejemplos específicos incluyen benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo y (dimetilamino)metileno. Los ejemplos específicos del grupo protector para el grupo hidroxilo incluyen 2-cianoetilo, 4-nitrofeniletilo, fenilsulfoniletilo, metilsulfoniletilo y trimetilsililetilo y fenilo, que pueden estar sustituidos con 1 a 5 grupos aceptores de electrones en posiciones sustituibles opcionales, difenilcarbamoilo, dimetilcarbamoilo, dietilcarbamoilo, metilfenilcarbamoilo, 1-pirolidinilcarbamoilo, morfolinocarbamoilo, 4-(terc-butilcarboxi)benzilo, 4-[(dimetilamino)carboxi]benzilo y 4-(fenilcarboxi)benzilo, (véase, p. ej., el documento WO 2009/064471).

El "portador sólido" no está particularmente limitado siempre que sea un portador utilizable para la reacción en fase sólida de ácidos nucleicos. Se desea que el portador sólido tenga las siguientes propiedades: p. ej., (i) sea escasamente soluble en reactivos que se pueden utilizar para la síntesis de derivados de ácido morfolinonucleico (p. ej., diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, N-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético); (ii) sea químicamente estable a los reactivos utilizables para la síntesis de derivados de ácido morfolinonucleico; (iii) se pueda modificar químicamente; (iv) se pueda cargar con derivados de ácido nucleico morfolino deseados; (v) tenga una resistencia suficiente para soportar una alta presión en los tratamientos; y (vi) tenga un intervalo y distribución del diámetro de partícula uniforme. Específicamente, el poliestireno hinchable (p. ej., resina de poliestireno aminometilada entrecruzada con dibencilbenzilo al 1% (malla 200-400) (2,4-3,0 mmoles/g) (fabricada por Tokyo Chemical Industry), Resina de Poliestireno Aminometilada · HCl [dibencilbenzilo al 1%, malla 100-200] (fabricada por Peptide Institute, Inc.)), poliestireno no hinchable (p. ej., Primer Support (fabricado por GE Healthcare)), poliestireno anclado a una cadena de PEG (p. ej., NH₂-Resina PEG (fabricada por Watanabe Chemical Co.), resina TentaGel), vidrio de poro controlado (vidrio de poro controlado; CPG) (fabricado por, p. ej., CPG), vidrio de poro controlado con oxalilo (véase, p. ej., Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), Soporte TentaGel-soporte derivado de aminopolietilenglicol (p. ej., Wright et al., véase, Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), y un copolímero de poliestireno/divinilbenzilo de Poros.

Un "conector" que se puede utilizar es un conector conocido generalmente utilizado para conectar ácidos nucleicos o derivados de ácido morfolinonucleico. Los ejemplos incluyen 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dietanolsulfonilo y un alquilamino de cadena larga (LCAA).

5 Esta etapa se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el Compuesto (II) con un ácido.

10 El "ácido" que se puede utilizar en esta etapa incluye, por ejemplo, ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético y ácido tricloroacético. El ácido utilizado está apropiadamente en un intervalo, por ejemplo, de 0,1 equivalentes en moles a 1000 equivalentes en moles basados en 1 mol de Compuesto (II), preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente en moles a 100 equivalentes en moles basados en 1 mol de Compuesto (II).

15 Se puede utilizar una amina orgánica combinada con el ácido descrito anteriormente. La amina orgánica no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, trietilamina. La cantidad de la amina orgánica utilizada está apropiadamente en un intervalo, p.ej., de 0,01 equivalentes en moles a 10 equivalentes en moles, y preferiblemente en un intervalo de 0,1 equivalentes en moles a 2 equivalentes en moles, basándose en 1 mol del ácido.

20 Cuando se utiliza una sal o una mezcla del ácido y la amina orgánica en esta etapa, la sal o la mezcla incluyen, por ejemplo, una sal o una mezcla de ácido trifluoroacético y trietilamina, y más específicamente, una mezcla de 1 equivalente de trietilamina y 2 equivalentes de ácido trifluoroacético.

25 El ácido que se puede utilizar en esta etapa también se puede emplear en forma de dilución con un disolvente apropiado a una concentración de 0,1% a 30%. El disolvente no está particularmente limitado en la medida en que sea inerte para la reacción, e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua o una mezcla de los mismos.

30 La temperatura de reacción en la reacción descrita anteriormente está preferiblemente en un intervalo, p. ej., de 10°C a 50°C, más preferiblemente, en un intervalo de 20°C a 40°C, y lo más preferiblemente, en un intervalo de 25°C a 35°C.

El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo de ácido utilizado y de la temperatura de reacción, y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 minutos a 24 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

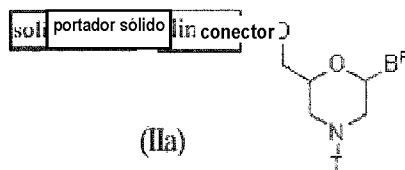
35 Después de completar esta etapa, se puede añadir una base, si fuera necesario, para neutralizar el ácido que permanece en el sistema. La "base" no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, diisopropilamina. La base también se puede utilizar en forma de una dilución con un disolvente apropiado a una concentración de 0,1% (v/v) a 30% (v/v).

40 El disolvente utilizado en esta etapa no está particularmente limitado siempre que sea inerte a la reacción, e incluye diclorometano, acetonitrilo, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua y una mezcla de los mismos. La temperatura de reacción está preferiblemente en un intervalo, p. ej., de 10°C a 50°C, más preferiblemente, en un intervalo de 20°C a 40°C, y lo más preferiblemente, en un intervalo de 25°C a 35°C.

45 El tiempo de reacción puede variar dependiendo de la base utilizada y de la temperatura de reacción, y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 minutos a 24 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

50 En el Compuesto (II), se puede producir el siguiente compuesto de fórmula general (IIa) (en adelante Compuesto (IIa)), en donde n es 1 y L es un grupo (IV), mediante el siguiente procedimiento.

[Fórmula 11]

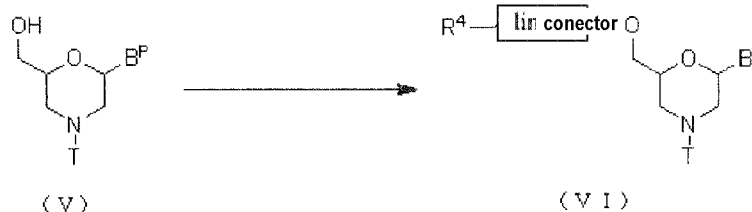


55 en donde B^P, T, el conector y el portador sólido tienen el mismo significado definido anteriormente.

Etapa 1:

El compuesto representado por la siguiente fórmula general (V) se hace reaccionar con un agente de acilación para preparar el compuesto representado por la siguiente fórmula general (VI) (en lo sucesivo denominado Compuesto (VI)).

[Fórmula 12]



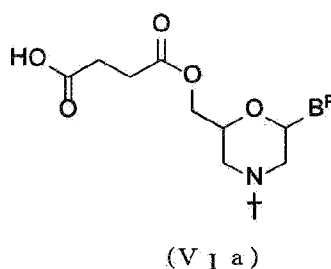
en donde B^P, T y el conector tienen el mismo significado definido anteriormente; y,

R⁴ representa hidroxí, un halógeno, un grupo carboxilo o amino.

Esta etapa se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos para introducir conectores, utilizando el Compuesto (V) como material de partida.

En particular, el compuesto representado por la siguiente fórmula general (VIa) se puede producir llevando a cabo el método conocido como esterificación, empleando el Compuesto (V) y anhídrido succínico.

[Fórmula 13]

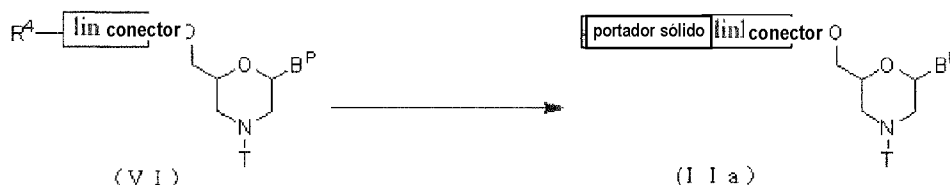


en donde B^P y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

Etapa 2:

El Compuesto (VI) se hace reaccionar con un portador sólido por medio de un agente de condensación para preparar el Compuesto (IIa).

[Fórmula 14]

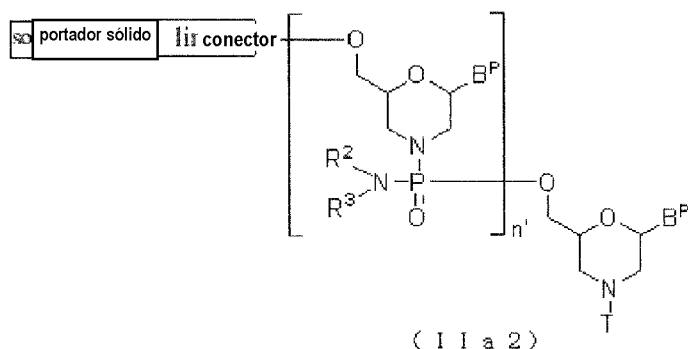


en donde B^P, R⁴, T, el conector y el portador sólido tienen el mismo significado definido anteriormente.

Esta etapa se puede llevar a cabo utilizando el Compuesto (VI) y un portador sólido de acuerdo con un procedimiento conocido como reacción de condensación.

En el Compuesto (II), se puede producir el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIa2) en donde n es de 2 a 99 y L es un grupo representado por la fórmula general (IV) utilizando el Compuesto (IIa) como material de partida y repitiendo la etapa A y la etapa B del método de producción de PMO descrito en la memoria descriptiva durante un número deseado de veces.

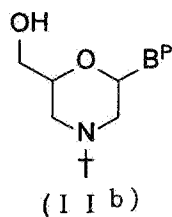
[Fórmula 15]



5 en donde B^P, R², R³, T, el conector y el portador sólido tienen el mismo significado definido anteriormente; y, n' representa de 1 a 98.

10 En el Compuesto (II), se puede producir el siguiente compuesto de fórmula general (IIb) en donde n es 1 y L es hidrógeno mediante el procedimiento descrito, p. ej., en el documento WO 1991/009033.

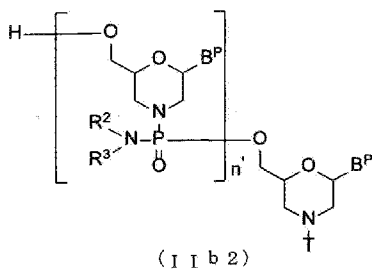
[Fórmula 16]



15 en donde B^P y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

20 En el Compuesto (II), se puede producir el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIb2) en donde n es de 2 a 99 y L es hidrógeno utilizando el Compuesto (IIb) como material de partida y repitiendo las etapas A y B del método de producción de PMO descrito en la memoria descriptiva un número deseado de veces.

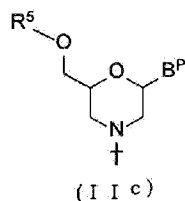
[Fórmula 17]



25 en donde B^P, n', R², R³ y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

30 En el Compuesto (II), se puede producir el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIc) en donde n es 1 y L es un acilo llevando a cabo el procedimiento conocido como reacción de acilación, utilizando el Compuesto (IIb).

[Fórmula 18]

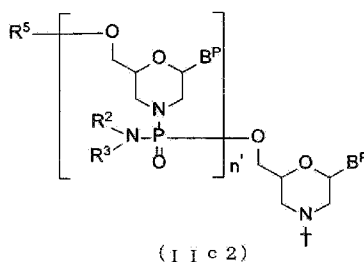


5 en donde B^P y T tienen el mismo significado definido anteriormente; y,
R⁵ representa un acilo.

10 En el Compuesto (II), se puede producir el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIc2) en donde n es de 2 a 99 y L es un acilo utilizando el Compuesto (IIc) como material de partida y repitiendo las etapas A y B del método de producción de PMO descrito en la memoria descriptiva un número deseado de veces.

[Fórmula 19]

15



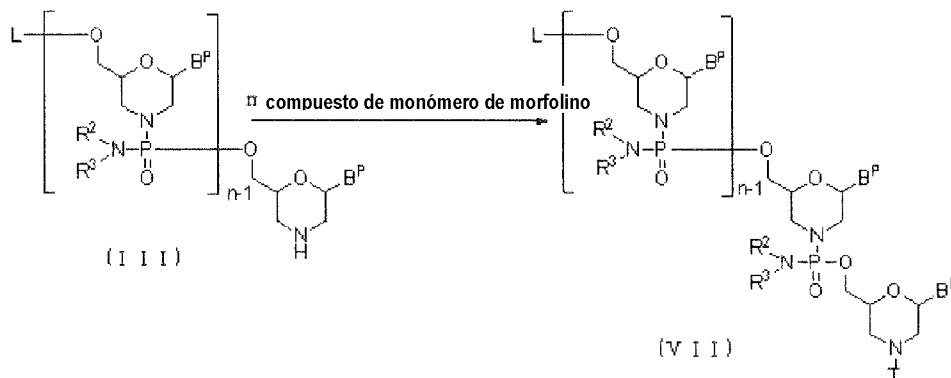
en donde B^P, n', R², R³, R⁵ y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

20 (2) Etapa B

El compuesto (III) se hace reaccionar con un compuesto de monómero de morfolino en presencia de una base para preparar el compuesto representado por la siguiente fórmula general (VII) (en adelante denominado Compuesto (VII)):

25

[Fórmula 20]

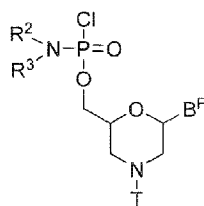


30 en donde B^P, L, n, R², R³ y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

Esta etapa se puede realizar haciendo reaccionar el Compuesto (III) con un compuesto de monómero de morfolino en presencia de una base.

35 El compuesto de monómero de morfolino incluye, por ejemplo, compuestos representados por la siguiente fórmula general (VIII):

[Fórmula 21]



(VII)

5 en donde B^p, R², R³ y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

10 La "base" que se puede utilizar en esta etapa incluye, por ejemplo, diisopropilamina, trietilamina y *N*-etilmorfolina. La cantidad de la base utilizada está apropiadamente en un intervalo de 1 equivalente en moles a 1000 equivalentes en moles basándose en 1 mol de Compuesto (III), preferiblemente, de 10 equivalentes en moles a 100 equivalentes en moles basándose en 1 mol de Compuesto (III).

15 El compuesto de monómero de morfolino y la base que se pueden utilizar en esta etapa también se pueden utilizar como una dilución con un disolvente apropiado a una concentración de 0,1% a 30%. El disolvente no está particularmente limitado en la medida en que sea inerte para la reacción, e incluye, por ejemplo, *N,N*-dimetilimidazolidona, *N*-metilpiperidona, DMF, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano o una mezcla de los mismos.

20 La temperatura de reacción está preferiblemente en un intervalo, p. ej., de 0°C a 100°C, y más preferiblemente, en un intervalo de 10°C a 50°C.

El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo de base utilizada y de la temperatura de reacción, y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 1 minuto a 48 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 30 minutos a 24 horas.

25 Además, después de completar esta etapa, se puede añadir un agente de acilación, si fuera necesario. El "agente acilante" incluye, por ejemplo, anhídrido acético, cloruro de acetilo y anhídrido fenoxiacético. El agente de acilación también se puede utilizar como una dilución con un disolvente apropiado a una concentración de 0,1% a 30%. El disolvente no está particularmente limitado en la medida en que sea inerte para la reacción, e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, uno o varios alcoholes (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua o una mezcla de los mismos.

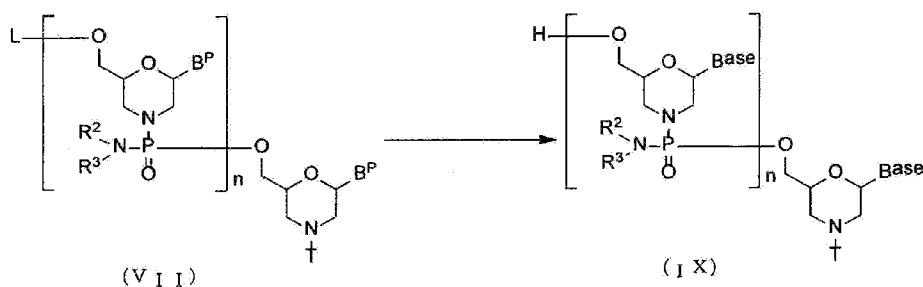
35 Si fuera necesario, también se puede utilizar una base tal como piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropilamina, *N*-etilmorfolina, etc. combinada con el agente de acilación. La cantidad del agente de acilación se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 equivalentes en moles a 10000 equivalentes en moles, y preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente en moles a 1000 equivalentes en moles. La cantidad de la base se encuentra apropiadamente en un intervalo, p. ej., de 0,1 equivalentes en moles a 100 equivalentes en moles, y preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente en moles a 10 equivalentes en moles, basándose en 1 mol del agente de acilación.

40 La temperatura de reacción en esta reacción se encuentra preferiblemente en un intervalo de 10°C a 50°C, más preferiblemente, en un intervalo de 10°C a 50°C, mucho más preferiblemente, en un intervalo de 20°C a 40°C, y lo más preferiblemente, en un intervalo de 25°C a 35°C. El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo de agente de acilación utilizado y de la temperatura de reacción, y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 minutos a 24 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

(3) Etapa C:

50 En el Compuesto (VII) producido en la Etapa B, el grupo protector se elimina utilizando un agente desprotector para preparar el compuesto representado por la fórmula general (IX).

[Fórmula 22]



5 en donde Base, B^{P} , L, n, R^2 , R^3 y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

Esta etapa se puede realizar haciendo reaccionar el Compuesto (VII) con un agente desprotector.

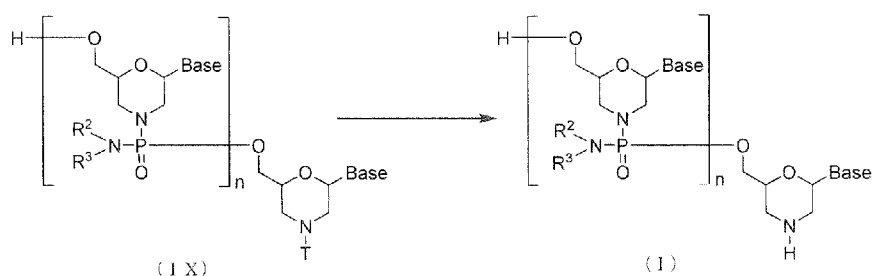
10 El "agente desprotector" incluye, *p. ej.*, agua amoniacal conc. y metilamina. El "agente desprotector" utilizado en esta etapa también se puede emplear como una dilución, *p. ej.*, con agua, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, DMF, N,N-dimetilimidazolidona, N-metilpiperidona, o una mezcla de estos disolventes. Entre otros, se prefiere el etanol. La cantidad del agente desprotector utilizado está apropiadamente en un intervalo de 1 equivalente en moles a 100.000 equivalentes en moles, y preferiblemente en un intervalo de 10 equivalentes en moles a 1000 equivalentes en moles, basándose en 1 mol del Compuesto (VII).

15 La temperatura de reacción se encuentra apropiadamente en un intervalo de 15°C a 75°C , preferiblemente, en un intervalo de 40°C a 70°C , y más preferiblemente, en un intervalo de 50°C a 60°C . El tiempo de reacción para la desprotección puede variar dependiendo del tipo de Compuesto (VII), de la temperatura de reacción, etc., y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 10 minutos a 30 horas, preferiblemente de 30 minutos a 24 horas, y más preferiblemente en un intervalo de 5 horas a 20 horas.

(4) Etapa D

25 Se produce el PMO (I) haciendo reaccionar el Compuesto (IX) producido en la etapa C con un ácido:

[Fórmula 23]



30 en donde Base, n, R^2 , R^3 y T tienen el mismo significado definido anteriormente.

Esta etapa se puede realizar añadiendo un ácido al Compuesto (IX).

35 El "ácido" que se puede utilizar en esta etapa incluye, por ejemplo, ácido tricloroacético, ácido dicloroacético, ácido acético, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, etc. El ácido utilizado se emplea apropiadamente para permitir que la solución tenga un intervalo de pH de 0,1 a 4,0, y más preferiblemente, en un intervalo de pH 1,0 a 3,0. El disolvente no está particularmente limitado siempre que sea inerte para la reacción, e incluye, por ejemplo, acetonitrilo, agua o una mezcla de estos disolventes.

40 La temperatura de reacción se encuentra apropiadamente en un intervalo de 10°C a 50°C , preferiblemente, en un intervalo de 20°C a 40°C , y más preferiblemente, en un intervalo de 25°C a 35°C . El tiempo de reacción para la desprotección puede variar dependiendo del tipo de Compuesto (IX), de la temperatura de reacción, etc., y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 minutos a 5 horas, preferiblemente de 1 minuto a 1 hora, y más preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 30 minutos.

45

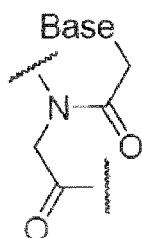
Se puede obtener el PMO (I) sometiendo la mezcla de reacción obtenida en esta etapa a medios convencionales de separación y purificación tales como extracción, concentración, neutralización, filtración, separación centrífuga, recristalización, cromatografía en columna de fase inversa C₈ a C₁₈, cromatografía en columna de intercambio catiónico, cromatografía en columna de intercambio aniónico, cromatografía en columna de filtración en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento, diálisis, ultrafiltración, etc., solos o combinando los mismos. Por lo tanto, el PMO deseado (I) se puede aislar y purificar (véase. p. ej., el documento WO 1991/09033).

En la purificación del PMO (I) utilizando cromatografía de fase inversa, p. ej., se puede utilizar una mezcla en solución de trietilamina 20 mM/tampón de acetato y acetonitrilo como disolvente de elución.

En la purificación del PMO (I) utilizando cromatografía de intercambio iónico, p. ej., se puede utilizar una mezcla en solución de solución salina 1 M y solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mM como disolvente de elución.

El ácido peptidonucleico descrito anteriormente es el oligómero de la presente invención que tiene un grupo representado por la siguiente fórmula general como unidad constitutiva:

[Fórmula 24]



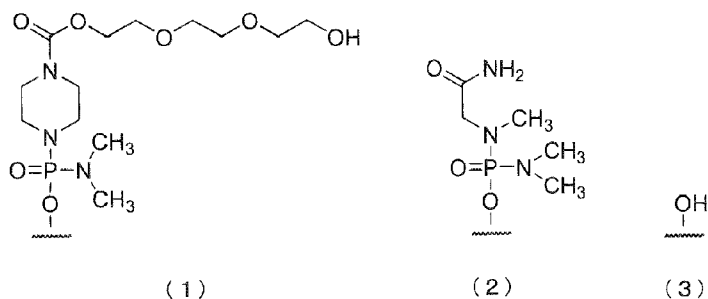
en donde Base tiene el mismo significado definido anteriormente.

Los ácidos peptidonucleicos se pueden preparar haciendo referencia, p. ej., a la siguiente bibliografía.

- 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)
- 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, Jacs., 114, 1895 (1992)
- 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994)
- 4) L. Christensen, R. Fitzpatrick, B. Gildea, K. H. Petersen, H. F. Hansen, T. Koch, M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, J. Coull, R. H. Berg, J. Pept. Sci., 1, 175 (1995)
- 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

En el oligómero de la presente invención, el extremo 5' puede ser cualquiera de las siguientes estructuras químicas (1) a (3), y preferiblemente es (3)-OH.

[Fórmula 25]



En lo sucesivo, los grupos mostrados por (1), (2) y (3) anteriormente se denominan "Grupo (1)", "Grupo (2)" y "Grupo (3)", respectivamente.

2. Composición farmacéutica

El oligómero de la presente invención provoca la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina. Por lo tanto, se espera que las condiciones de distrofia muscular se puedan aliviar administrando la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención a pacientes con DMD, que tienen la mutación diana de omisión del exón 44, esto es la mutación que se convierte en marco por la omisión del Exón 44. Asimismo, el procedimiento de fabricación del oligómero de la presente invención, cuya longitud de cadena es corta, es simple y el coste de fabricación del oligómero de la presente invención se puede reducir.

En otra realización, la presente invención proporciona la composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como ingrediente activo el oligómero de la presente invención, una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo (en lo sucesivo denominado "la composición de la presente invención").

Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención son sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, potasio y litio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio; sales metálicas tales como sales de aluminio, hierro, cinc, cobre, níquel, cobalto, etc.; sales de amonio; sales de amins orgánicas tales como sales de t-octilamina, dibencilamina, morfolina, glucosamina, éster alquílico de fenilglicina, etilendiamina, *N*-metilglucamina, guanidina, dietilamina, trietilamina, dicitlohexilamina, *N,N'*-dibenciletildiamina, cloroprocaína, procaína, dietanolamina, *N*-bencilfenetilamina, piperazina, tetrametilamonio, tris(hidroximetil)aminometano; sales hidroháluro tales como sales de compuestos hidrofluorados, hidroclouros, hidrobromuros e hidroyoduros; sales de ácido inorgánico tales como nitratos, percloratos, sulfatos, fosfatos, etc.; alcanosulfonatos inferiores tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; arilsulfonatos tales como bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartaratos, oxalatos, maleatos, etc.; y sales de aminoácidos tales como sales de glicina, lisina, arginina, ornitina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estas sales pueden ser producidas por métodos conocidos. Alternativamente, el oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención puede estar en forma de un hidrato del mismo.

La ruta de administración para la composición de la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea una ruta farmacéuticamente aceptable para la administración, y se puede elegir dependiendo del método de tratamiento. En vista de la facilidad de suministro a los tejidos musculares, se prefieren la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular, la administración subcutánea, la administración oral, la administración en tejidos, la administración transdérmica, etc. Asimismo, las formas de dosificación que están disponibles para la composición de la presente invención no están particularmente limitadas e incluyen, por ejemplo, varias inyecciones, agentes orales, goteos, inhalaciones, pomadas, lociones, etc.

En la administración del oligómero de la presente invención a pacientes con distrofia muscular, la composición de la presente invención contiene preferiblemente un portador para promover el suministro del oligómero a los tejidos musculares. Tal portador no está particularmente limitado en la medida en que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos incluyen portadores catiónicos tales como liposomas catiónicos, polímeros catiónicos, etc., o portadores que utilizan envoltura viral. Los liposomas catiónicos son, por ejemplo, liposomas compuestos por 2-O-(2-dietilaminoetil)carabamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y fosfolípidos como componentes esenciales (en lo sucesivo denominados "liposoma A"), Oligofectamine (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectin (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectamine (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectamine 2000 (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), DMRIE -C (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), GeneSilencer (marca registrada) (fabricado por Gene Therapy Systems), TransMessenger (marca registrada) (fabricado por QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (marca registrada) (fabricado por Mirus) y Nucleofector II (Lonza). Entre otros, se prefiere el liposoma A. Los ejemplos de polímeros catiónicos son JetSI (marca registrada) (fabricado por Qbiogene, Inc.) y Jet-PEI (marca registrada) (polietilimina, fabricado por Qbiogene, Inc.). Un ejemplo de portadores que utilizan envoltura viral es GenomeOne (marca registrada) (liposoma HVJ-E, fabricado por Ishihara Sangyo). Alternativamente, también se puede utilizar los dispositivos médicos descritos en la Patente japonesa No. 2924179 y los portadores catiónicos descritos en la Re-Publicación Nacional Japonesa PCT Núm. 2006/129594 y 2008/096690.\$

La concentración del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención puede variar dependiendo del tipo de portador, etc., y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 nM a 100 µM, preferiblemente en un intervalo de 1 nM a 10 µM, y más preferiblemente en un intervalo de 10 nM a 1 µM. La razón en peso del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención y el portador (portador/oligómero de la presente invención) puede variar dependiendo de las propiedades del oligómero, del tipo de portador, etc., y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 a 100, preferiblemente en un intervalo de 1 a 50, y más preferiblemente en un intervalo de 10 a 20.

Además del oligómero de la presente invención y el portador descrito anteriormente, también se pueden formular opcionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables en la composición de la presente invención. Los ejemplos de tales aditivos son coadyuvantes de emulsión (p. ej., ácidos grasos que tienen de 6 a 22 átomos de carbono y sus sales farmacéuticamente aceptables, albúmina y dextrano), estabilizadores (p. ej., colesterol y ácido fosfatídico), agentes para conferir isotonicidad (p. ej., cloruro de sodio, glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y agentes de control del pH (p. ej., ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y trietanolamina). Se pueden utilizar uno o más de estos aditivos. El contenido del aditivo en la composición de la presente invención es apropiadamente de 90% en peso o menos, preferiblemente 70% en peso o menos y más preferiblemente, 50% en peso o menos.

La composición de la presente invención se puede preparar añadiendo el oligómero de la presente invención a una dispersión de portador y agitando adecuadamente la mezcla. Se pueden añadir aditivos en una etapa apropiada antes o después de la adición del oligómero de la presente invención. El disolvente acuoso que se puede utilizar para añadir el oligómero de la presente invención no está particularmente limitado en la medida en que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos son agua inyectable o agua destilada inyectable, fluido electrolítico tal como solución salina fisiológica, etc., y fluido de azúcar tal como fluido de glucosa, fluido de maltosa, etc. Un experto en la técnica puede elegir apropiadamente las condiciones de pH y temperatura para tal materia.

La composición de la presente invención se puede preparar, p. ej., en una forma líquida y su preparación liofilizada. La preparación liofilizada se puede preparar liofilizando la composición de la presente invención en forma líquida de manera convencional. La liofilización se puede realizar, por ejemplo, esterilizando apropiadamente la composición de la presente invención en forma líquida, dispensando una alícuota en un vial como recipiente, realizando una congelación preliminar durante 2 horas en condiciones de aproximadamente -40 a -20°C, realizando un secado primario de 0 a 10°C a presión reducida, y a continuación realizando un secado secundario de aproximadamente 15 a 25°C a presión reducida. En general, la preparación liofilizada de la composición de la presente invención se puede obtener reemplazando el contenido del vial por gas nitrógeno y tapando.

La preparación liofilizada de la composición de la presente invención se puede utilizar en general tras la reconstitución añadiendo una solución adecuada opcional (líquido de reconstitución) y redisolviendo la preparación. Tal líquido de reconstitución incluye agua inyectable, solución salina fisiológica y otros fluidos de infusión. El volumen del líquido de reconstitución puede variar según el uso previsto, etc., no está particularmente limitado, y es adecuadamente de 0,5 a 2 veces mayor que el volumen antes de la liofilización o no más de 500 mL.

Se desea controlar una dosis de la composición de la presente invención que se va a administrar, teniendo en cuenta los siguientes factores: el tipo y la forma de dosificación del oligómero de la presente invención contenido; las condiciones del paciente, incluyendo edad, peso corporal, etc. la ruta de administración; y las características y el grado de la enfermedad. La dosis diaria calculada como la cantidad del oligómero de la presente invención se encuentra generalmente en un intervalo de 0,1 mg a 10 g/humano, y preferiblemente de 1 mg a 1 g/humano. Este intervalo numérico puede variar ocasionalmente dependiendo del tipo de enfermedad diana, la ruta de administración y la molécula diana. Por lo tanto, una dosis más baja que el intervalo puede ser suficiente en alguna ocasión y, por el contrario, se puede requerir ocasionalmente una dosis más alta que el intervalo. La composición se puede administrar de una vez a varias veces al día o a intervalos de un día a varios días.

En otra realización más de la composición de la presente descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector capaz de expresar el oligonucleótido de la presente invención y el portador descrito anteriormente. Tal vector de expresión puede ser un vector capaz de expresar una pluralidad de los oligonucleótidos de la presente invención. La composición se puede formular con aditivos farmacéuticamente aceptables como en el caso de la composición de la presente invención que contiene el oligómero de la presente invención. La concentración del vector de expresión contenido en la composición puede variar dependiendo del tipo de portador, etc., y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 nM a 100 µM, preferiblemente en un intervalo de 1 nM a 10 µM, y más preferiblemente en un intervalo de 10 nM a 1 µM. La razón en peso del vector de expresión contenido en la composición y el portador (portador/vector de expresión) puede variar dependiendo de las propiedades del vector de expresión, el tipo de portador, etc., y se encuentra apropiadamente en un intervalo de 0,1 a 100, preferiblemente en un intervalo de 1 a 50, y más preferiblemente en un intervalo de 10 a 20. El contenido del portador contenido en la composición es el mismo que en el caso de la composición de la presente invención que contiene el oligómero de la presente invención, y el método para producir el mismo también es el mismo que en el caso con la composición de la presente invención.

En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes EJEMPLOS y los EJEMPLOS DE ENSAYO, pero no se considera que esté limitada a los mismos.

[Ejemplos]**[Ejemplo de Referencia 1]**

5 Ácido 4-[[{(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado sobre resina de amino poliestireno

Etapa 1: Producción de ácido 4-[[{(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico

10

En atmósfera de argón, se suspendieron 3,44 g de N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida y 1,1 g de 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) en 50 mL de diclorometano, y se añadieron 0,90 g de anhídrido succínico a la suspensión, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. A la mezcla de reacción se le añadieron 10 mL de metanol, y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo utilizando acetato de etilo y una solución acuosa 0,5 M de dihidrogenofosfato de potasio. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con solución acuosa de dihidrogenofosfato de potasio 0,5 M, agua y salmuera en el orden mencionado. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para proporcionar 4,0 g del producto.

15

20 Etapa 2: Producción de ácido 4-[[{(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado sobre resina de amino poliestireno

Después de disolver 4,0 g de ácido 4-[[{(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico en 200 mL de piridina (deshidratada), se añadieron a la solución 0,73 g de 4-DMAP y 11,5 g de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. A continuación, se añadieron a la mezcla 25,0 g de resina de amino poliestireno Primer Support 200 amino (fabricado por GE Healthcare Japan Co., Ltd., 17-5214-97) y 8,5 mL de trietilamina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 días. Una vez completada la reacción, la resina se retiró por filtración. La resina resultante se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano en el orden mencionado, y se secó a presión reducida. A la resina resultante se le añadieron 200 mL de tetrahidrofurano (deshidratado), 15 mL de anhídrido acético y 15 mL de 2,6-lutidina, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración, se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano en el orden mencionado, y se secó a presión reducida para proporcionar 26,7 g del producto.

25

30

35 La cantidad de carga del producto se determinó a partir de la cantidad en moles de tritilo por g de resina midiendo la absorbancia UV a 409 nm utilizando un método conocido. La cantidad de carga de la resina fue de 192,2 µmoles/g.

Condiciones de medición de UV

40

Aparato: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Disolvente: ácido metanosulfónico

45

Longitud de onda: 265 nm

Valor ε: 45000

[Ejemplo de Referencia 2]

50

Ácido 4-[[{(2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno

El compuesto del título se produjo de una manera similar a la del EJEMPLO DE REFERENCIA 1, excepto que se utilizó 1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidin-2,4-(1H,3H)-diona en lugar de la N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida utilizada en la Etapa 1 del EJEMPLO DE REFERENCIA 1.

55

La cantidad de carga del producto se determinó a partir de la cantidad en moles de tritilo por g de resina midiendo la absorbancia UV a 409 nm utilizando un método conocido. La cantidad de carga de la resina fue de 164,0 µmoles/g.

60

[Ejemplo de Referencia 3]

65 Ácido 4-[[{(2S,6R)-6-(6-benzamidopurin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno

El compuesto del título se produjo de una manera similar a la del EJEMPLO DE REFERENCIA 1, excepto que se utilizó en esta etapa N-{9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-purin-6-il}benzamida en lugar de la N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida utilizada en la Etapa 1 del EJEMPLO DE REFERENCIA 1.

5

La cantidad de carga del producto se determinó a partir de la cantidad en moles de tritilo por g de resina midiendo la absorbancia UV a 409 nm utilizando un método conocido. La cantidad de carga de la resina fue de 185,7 µmoles/g.

10 [Ejemplo de Referencia 4]

Ácido 4-{{(2S,6R)-6-{6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purin-9-il}-4-tritilmorfolin-2-il}metoxi}-4-oxobutanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno

15

El compuesto del título se produjo de una manera similar a la del EJEMPLO DE REFERENCIA 1, excepto que se utilizó en esta etapa N-{6-(2-cianoetoxi)-9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-purin-2-il}-2-fenoxiacetamida en lugar de la N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida utilizada en la Etapa 1 del EJEMPLO DE REFERENCIA 1.

20

La cantidad de carga del producto se determinó a partir de la cantidad en moles de tritilo por g de resina midiendo la absorbancia UV a 409 nm utilizando un método conocido. La cantidad de carga de la resina fue de 164,8 µmoles/g.

25

De acuerdo con las descripciones de los siguientes Ejemplos 1, se sintetizaron los PMO mostrados por los Núm. de PMO 1-118 de la Tabla 1. Los PMO Núm. 119 y 120 se adquirieron de Gene Tools, LLC. El PMO sintetizado se disolvió en agua para inyectables (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

[Tabla 1-1]

30 [Tabla 1]

Núm. PMO	Secuencia diana posicionada en el exón 44	Nota	SEQ ID NO:
1	11-23 y 91-103	Extremo 5': grupo (3)	11
2	11-23 y 61-73	Extremo 5': grupo (3)	12
3	11-23 y 71-83	Extremo 5': grupo (3)	13
4	21-33 y 91-103	Extremo 5': grupo (3)	14
5	21-33 y 81-93	Extremo 5': grupo (3)	15
6	21-33 y 101-113	Extremo 5': grupo (3)	16
7	21-33 y 61-73	Extremo 5': grupo (3)	17
8	21-33 y 71-83	Extremo 5': grupo (3)	18
9	21-35 y 101-115	Extremo 5': grupo (3)	19
10	11-25 y 91-105	Extremo 5': grupo (3)	20
11	16-25 y 101-115	Extremo 5': grupo (3)	21
12	21-35 y 91-105	Extremo 5': grupo (3)	22
13	11-23 y 101-113	Extremo 5': grupo (3)	23
14	23-35 y 91-103	Extremo 5': grupo (3)	24
15	19-31 y 91-103	Extremo 5': grupo (3)	25
16	21-33 y 89-101	Extremo 5': grupo (3)	26
17	11-23 y 81-93	Extremo 5': grupo (3)	27
18	19-31 y 93-105	Extremo 5': grupo (3)	28
19	23-35 y 89-101	Extremo 5': grupo (3)	29
20	23-35 y 93-105	Extremo 5': grupo (3)	30
21	22-33 y 92-103	Extremo 5': grupo (3)	31
22	91-103 y 21-33	Extremo 5': grupo (3)	32
23	22-32 y 92-102	Extremo 5': grupo (3)	33
24	22-31 y 93-102	Extremo 5': grupo (3)	34
25	19-31 y 59-71	Extremo 5': grupo (3)	35
26	21-33 y 93-105	Extremo 5': grupo (3)	36
27	21-33 y 63-75	Extremo 5': grupo (3)	37
28	19-31 y 61-73	Extremo 5': grupo (3)	38
29	19-31 y 63-75	Extremo 5': grupo (3)	39
30	21-33 y 59-71	Extremo 5': grupo (3)	40
31	23-35 y 61-73	Extremo 5': grupo (3)	41

ES 3 027 057 T3

32	23-35 y 63-75	Extremo 5': grupo (3)	42
33	23-35 y 59-71	Extremo 5': grupo (3)	43
34	19-31 y 89-101	Extremo 5': grupo (3)	6
35	61-73 y 91-103	Extremo 5': grupo (3)	44
36	61-73 y 72-84	Extremo 5': grupo (3)	45
37	24-33 y 62-71	Extremo 5': grupo (3)	46
38	24-33 y 65-74	Extremo 5': grupo (3)	47
39	61-70 y 75-84	Extremo 5': grupo (3)	48
40	22-31 y 65-74	Extremo 5': grupo (3)	49
41	17-29 y 91-103	Extremo 5': grupo (3)	50
42	33-44 y 62-74	Extremo 5': grupo (3)	51
43	26-37 y 65-76	Extremo 5': grupo (3)	52
44	23-33 y 61-71	Extremo 5': grupo (3)	53
45	23-33 y 65-75	Extremo 5': grupo (3)	7
46	22-32 y 64-74	Extremo 5': grupo (3)	54
47	59-68 y 77-86	Extremo 5': grupo (3)	55
48	58-70 y 75-87	Extremo 5': grupo (3)	56
49	22-33 y 63-74	Extremo 5': grupo (3)	8
50	61-73 y 81-93	Extremo 5': grupo (3)	57
51	93-103 y 25-35	Extremo 5': grupo (3)	58
52	17-29 ATT 91-102	Extremo 5': grupo (3)	59
53	92-103 y 22-33	Extremo 5': grupo (3)	60
54	91-103 y 19-31	Extremo 5': grupo (3)	61
55	61-73 y 19-31	Extremo 5': grupo (3)	62
56	61-73 y 85-97	Extremo 5': grupo (3)	63
57	69-81 CTCC 61-68	Extremo 5': grupo (3)	64
58	93-105 y 23-35	Extremo 5': grupo (3)	65
59	90-103 y 25-36	Extremo 5': grupo (3)	66
60	CT-[61-76]-AC	Extremo 5': grupo (3)	67
61	84-96 y 21-33	Extremo 5': grupo (3)	68
62	81-93 y 23-35	Extremo 5': grupo (3)	69
63	CC-[61-80]-CC	Extremo 5': grupo (3)	70
64	CTT-[61-78]-CCC	Extremo 5': grupo (3)	71
65	84-93 y 23-33	Extremo 5': grupo (3)	72
66	89-101 y 19-31	Extremo 5': grupo (3)	73
67	91-103 y 61-73	Extremo 5': grupo (3)	74
68	61-71 y 91-105	Extremo 5': grupo (3)	75
69	20-30 y 89-99	Extremo 5': grupo (3)	76
70	64-74 y 93-103	Extremo 5': grupo (3)	77
71	20-31 y 89-100	Extremo 5': grupo (3)	78
72	1-13 y 76-88	Extremo 5': grupo (3)	79
73	64-75 y 92-103	Extremo 5': grupo (3)	9
74	99-108 y 19-34	Extremo 5': grupo (3)	80
75	58-67 y 76-85	Extremo 5': grupo (3)	81
76	58-67 y 77-86	Extremo 5': grupo (3)	82
77	23-33 y 92-102	Extremo 5': grupo (3)	83
78	20-30 y 90-100	Extremo 5': grupo (3)	84
79	93-104 y 22-33	Extremo 5': grupo (3)	85
80	93-103 y 23-33	Extremo 5': grupo (3)	86
81	64-73 y 76-85	Extremo 5': grupo (3)	87
82	64-74 y 86-95	Extremo 5': grupo (3)	88
83	58-66 y 77-85	Extremo 5': grupo (3)	89
84	64-73 y 84-93	Extremo 5': grupo (3)	90
85	21-31 y 90-100	Extremo 5': grupo (3)	91
86	20-30 y 87-97	Extremo 5': grupo (3)	92
87	27-36 y 89-97	Extremo 5': grupo (3)	93
88	20-29 ATT 91-100	Extremo 5': grupo (3)	94
89	20-29 ATT 91-97	Extremo 5': grupo (3)	95
90	20-29 y 88-97	Extremo 5': grupo (3)	96
91	22-31 y 63-74	Extremo 5': grupo (3)	97
92	64-76 y 96-102 +C	Extremo 5': grupo (3)	98
93	58-68 y 77-85 +C	Extremo 5': grupo (3)	99
94	22-36 y 89-97	Extremo 5': grupo (3)	100

ES 3 027 057 T3

95	19-31 y 89-100	Extremo 5': grupo (3)	101
96	22-31 y 87-97	Extremo 5': grupo (3)	102
97	-1-11 y 62-73	Extremo 5': grupo (3)	103
98	-1-11 y 89-100	Extremo 5': grupo (3)	104
99	-1-11 y 20-31	Extremo 5': grupo (3)	105
100	20-31 y 89-101	Extremo 5': grupo (3)	106
101	19-31 y 90-101	Extremo 5': grupo (3)	107
102	20-31 y 90-101	Extremo 5': grupo (3)	108
103	-1-13 y 76-82	Extremo 5': grupo (3)	109
104	-1-10 y 63-73	Extremo 5': grupo (3)	110
105	-1-10 y 90-100	Extremo 5': grupo (3)	111
106	-1-10 y 20-30	Extremo 5': grupo (3)	112
107	20-31 y 91-101	Extremo 5': grupo (3)	113
108	19-31 y 89-101	Extremo 5': grupo (3)	6
		Extremo 3': acetilación	
109	20-31	Extremo 5': grupo (3)	114
110	65-75	Extremo 5': grupo (3)	115
111	23-33	Extremo 5': grupo (3)	116
112	92-103	Extremo 5': grupo (3)	117
113	64-75	Extremo 5': grupo (3)	118
114	89-101	Extremo 5': grupo (3)	119
115	19-31	Extremo 5': grupo (3)	120
116	20-31 y 89-101	Extremo 5': grupo (3)	106
		Extremo 3': acetilación	
117	63-74	Extremo 5': grupo (3)	121
118	22-33	Extremo 5': grupo (3)	122
119	59-68	Extremo 5': grupo (2)	123
120	77-86	Extremo 5': grupo (2)	124

[Ejemplo 1]

- 5 Como base en el extremo 5', se cargaron 0,2 g en una columna, con un filtro, ácido 4-[(2S, 6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico soportado sobre una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 1), ácido 4-[(2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico soportado sobre una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 2), ácido 4-[(2S, 6R)-6-(6-benzamidopurin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico soportado sobre una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 3) o ácido 4-[(2S, 6R)-6-(6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico soportado sobre resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 4). A continuación, se inició el ciclo sintético mostrado más abajo utilizando un sintetizador oligonucleotídico (AKTA Oligopilot 10 plus). El compuesto de monómero de morfolino deseado se añadió a cada ciclo de acoplamiento para proporcionar la secuencia de bases descrita en la Tabla 1 (véase la siguiente Tabla 2).

[TABLA 2]

Etapa	Reactivo	Volumen (mL)	Tiempo (min)
1	solución de desbloqueo	18 a 32	1,8 a 3,2
2	solución neutralizadora y de lavado	30	1,5
3	solución de acoplamiento B	5	0,5
4	solución de acoplamiento A	1,3	0,25
5	reacción de acoplamiento por los reactivos añadidos en las etapas 3 y 4		120 a 300
6	acetonitrilo	20	1,0
7	solución de protección terminal	9	2,0
8	acetonitrilo	30	2,0

Nota: Las etapas 1, 2, 7 y 8 se realizaron de nuevo después del ciclo final solamente en el

caso de acetilación del extremo 3'.

La solución de desbloqueo utilizada fue una solución de diclorometano que contenía ácido trifluoroacético al 3% (p/v). La solución neutralizadora y de lavado utilizada fue una solución obtenida disolviendo N,N-diisopropiletilamina para que estuviera al 10% (v/v) y tetrahidrofurano para que estuviera al 5% (v/v) en diclorometano que contenía acetonitrilo al 35% (v/v). La solución de acoplamiento A utilizada fue una solución obtenida disolviendo el compuesto de monómero de morfolino en tetrahidrofurano para que fuera 0,10 M. La solución de acoplamiento B utilizada fue una solución obtenida disolviendo N,N-diisopropiletilamina para que estuviera al 20% (v/v) y tetrahidrofurano para que estuviera al 10% (v/v) en acetonitrilo. La solución de protección terminal utilizada fue una solución obtenida disolviendo anhídrido acético al 20% (v/v) y 2,6-lutidina al 30% (v/v) en acetonitrilo.

La resina de aminopoliestireno cargada con el PMO sintetizado anteriormente se recuperó del recipiente de reacción y se secó a temperatura ambiente durante al menos 2 horas a presión reducida. El PMO seco cargado sobre la resina de aminopoliestireno se cargó en un recipiente de reacción, y se añadieron a la misma 5 mL de agua amoniacal-etanol al 28% (1/4). La mezcla se agitó a 55°C durante 15 horas. La resina de aminopoliestireno se separó por filtración y se lavó con 1 mL de agua-etanol (1/4). El producto filtrado resultante se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 10 mL de una mezcla disolvente de ácido acético 20 mM - tampón de trietilamina (tampón TEAA) y acetonitrilo (4/1) y se filtró a través de un filtro de membrana. El producto filtrado obtenido se purificó por HPLC de fase inversa. Las condiciones utilizadas son las que se muestran en la siguiente Tabla 3.

[TABLA 3]

Columna	XBridge 5 µm C18 (Waters, φ19x50 mm, 1CV = 14 mL)
Velocidad de flujo	10 mL/min
Temperatura de la columna	temperatura ambiente
Solución A	Tampón de TEAA 20 mM
Solución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 10 → 70%/15 CV

CV: Volumen de la columna

Cada fracción se analizó y el producto objetivo se recuperó y se concentró a presión reducida. Al residuo concentrado se le añadieron 0,5 mL de solución acuosa de ácido fosfórico 2 M, y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Además, se añadieron 2 mL de solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M para volver alcalina la mezcla, seguido de filtración a través de un filtro de membrana (0,45 µm).

La solución acuosa resultante que contenía el producto objetivo se purificó mediante una columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones utilizadas se muestran en la siguiente Tabla 4.

[TABLA 4]

Columna	Fuente 15Q (GE Healthcare, φ10x 108 mm, 1CV = 8,5 mL)
Velocidad de flujo	8,5 mL/min
Temperatura de la columna	temperatura ambiente
Solución A	solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mM
Solución B	solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mM, solución acuosa de cloruro de sodio 1M
Gradiente	(B) conc. 1 → 50% / 40CV

Cada fracción se analizó (en HPLC) y el producto objetivo se obtuvo en forma de una solución acuosa. A la solución acuosa resultante se le añadió tampón de fosfato 0,1 M (pH 6,0) para la neutralización. A continuación, la mezcla obtenida se sometió a eliminación de las sales mediante HPLC de fase inversa en las condiciones descritas en la siguiente Tabla 5.

[TABLA 5]

Columna	XBridge 5 μ m C8 (Waters, ϕ 10x50 mm, 1CV = 4 mL)
Velocidad de flujo	4 mL/min
Temperatura de la columna	60°C
Solución A	agua
Solución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 0 \rightarrow 50% / 20CV

El producto objetivo se recuperó y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en agua. La solución acuosa obtenida se liofilizó para proporcionar el compuesto objetivo en forma de un sólido de tipo algodonoso.

5

Los valores calculados y los valores encontrados de ESI-TOF-MS se representan en la siguiente Tabla 6.

[Tabla 6-1]

10

[TABLA 6]

Núm. PMO	Secuencia diana en el exón 44	Calculado	Encontrado
1	H44 11-23 91-103	8539,94	8539,52
2	H44 11-23 61-73	8551,97	8552,69
3	H44 11-23 71-83	8533,95	8535,46
4	H44 21-33 91-103	8507,92	8507,71
5	H44 21-33 81-93	8543,96	8543,98
6	H44 21-33 101-113	8534,95	8535,75
7	H44 21-33 61-73	8519,95	8520,14
8	H44 21-33 71-83	8501,93	8501,81
9	H44 21-35 101-115	9882,42	9882,06
10	H44 11-25 91-105	9869,39	9870,94
11	H44 16-25 101-115	8226,85	8227,78
12	H44 21-35 91-105	9855,39	9855,53
13	H44 11-23 101-113	8566,97	8566,58
14	H44 23-35 91-103	8540,94	8541,52
15	H44 19-31 91-103	8491,92	8491,90
16	H44 21-33 89-101	8541,94	8541,87
17	H44 11-23 81-93	8575,98	8576,67
18	H44 19-31 93-105	8475,92	8476,50
19	H44 23-35 89-101	8574,96	8574,70
20	H44 23-35 93-105	8524,94	8524,71
21	H44 22-33 92-103	7822,69	7823,21
22	H44 91-103 21-33	8507,92	8508,59
23	H44 22-32 92-102	7177,47	7177,58
24	H44 22-31 93-102	6492,24	6492,03
25	H44 19-31 59-71	8478,94	8478,90
26	H44 21-33 93-105	8491,92	8492,33
27	H44 21-33 63-75	8470,93	8471,00
28	H44 19-31 61-73	8503,95	8503,87
29	H44 19-31 63-75	8454,93	8454,94
30	H44 21-33 59-71	8494,94	8494,90
31	H44 23-35 61-73	8552,97	8552,40
32	H44 23-35 63-75	8503,95	8504,17
33	H44 23-35 59-71	8527,96	8527,97
34	H44 19-31 89-101	8525,94	8525,93
35	H44 61-73 91-103	8595,95	8595,95
36	H44 61-73 72-84	8589,96	8590,03
37	H44 24-33 62-71	6520,27	6519,69
38	H44 24-33 65-74	6520,27	6520,36
39	H44 61-70 75-84	6574,28	6573,63
40	H44 22-31 65-74	6495,26	6495,21
41	H44 17-29 91-103	8515,93	8515,62

ES 3 027 057 T3

42	H44 33-44 62-74	8254,88	8254,88
43	H44 26-37 65-76	7876,75	7876,96
44	H44 23-33 61-71	7189,50	7189,75
45	H44 23-33 65-75	7180,49	7180,75
46	H44 22-32 64-74	7165,49	7165,64
47	H44 59-68 77-86	6559,28	6559,32
48	H44 58-70 75-87	8566,97	8567,64
49	H44 22-33 63-74	7810,71	7810,77
50	H44 61-73 81-93	8631,99	8632,04
51	H44 93-103 25-35	7195,49	7195,55
52	H44 17-29 ATT 91-102	9185,16	9186,41
53	H44 92-103 22-33	7822,69	7822,17
54	H44 91-103 19-31	8491,92	8491,77
55	H44 61-73 19-31	8503,95	8503,41
56	H44 61-73 85-97	8591,98	8591,55
57	H44 69-81 CTCC 61-68	8164,83	8165,78
58	H44 93-105 23-35	8524,94	8525,05
59	H44 90-103 25-36	8558,96	8558,71
60	CT-[H44 61-76]-AC	6534,27	6534,04
61	H44 84-96 21-33	8518,95	8518,86
62	H44 81-93 23-35	8576,98	8577,13
63	CC-[H44 61-80]-CC	7819,72	7818,92
64	CTT-[H44 61-78]-CCC	7825,71	7825,02
65	H44 84-93 23-33	6883,40	6882,97
66	H44 89-101 19-31	8525,94	8526,46
67	H44 91-103 61-73	8595,95	8595,17
68	H44 61-71 91-105	8579,95	8579,71
69	H44 20-30 89-99	7186,48	7186,30
70	H44 64-74 93-103	7201,48	7202,00
71	H44 20-31 89-100	7831,70	7831,77
72	H44 1-13 76-88	8551,97	8552,42
73	H44 64-75 92-103	7861,70	7861,72
74	H44 99-108 19-34	8583,97	8583,87
75	H44 58-67 76-85	6534,27	6533,87
76	H44 58-67 77-86	6543,28	6542,70
77	H44 23-33 92-102	7177,47	7176,76
78	H44 20-30 90-100	7161,47	7161,32
79	H44 93-104 22-33	7822,69	7823,23
80	H44 93-103 23-33	7177,47	7177,09
81	H44 64-73 76-85	6550,27	6549,41
82	H44 64-74 86-95	6922,41	6921,39
83	H44 58-66 77-85	5889,05	5888,11
84	H44 64-73 84-93	6592,30	6591,14
85	H44 21-31 90-100	7161,47	7160,62
86	H44 20-30 87-97	7179,49	7178,65
87	H44 27-36 89-97	6214,17	6213,81
88	H44 20-29 ATT 91-100	7506,58	7505,79
89	H44 20-29 ATT 91-97	6491,24	6490,34
90	H44 20-29 88-97	6525,26	6523,73
91	H44 22-31 63-74	7140,48	7139,34
92	H44 64-76 96-102+C	6871,37	6869,58
93	H44 58-68 77-85+C	6874,39	6872,78
94	H44 22-36 89-97	7858,73	7859,53
95	H44 19-31 89-100	8170,82	8171,89
96	H44 22-31 87-97	6849,38	6849,17
97	H44 1-11 62-73	7898,74	7899,01
98	H44 1-11 89-100	7904,73	7904,14
99	H44 1-11 20-31	7794,71	7794,30
100	H44 20-31 89-101	8186,82	8186,63
101	H44 19-31 90-101	8170,82	8170,92
102	H44 20-31 90-101	7831,70	7831,48
103	H44 1-13 76-82	6849,38	6848,35
104	H44 1-10 63-73	7213,51	7211,46

ES 3 027 057 T3

105	H44 1-10 90-100	7219,50	7218,65
106	H44 1-10 20-30	7149,49	7151,40
107	H44 20-31 91-101	7492,58	7493,67
108	H44 19-31 89-101(N-Ac)	8567,95	8568,51
109	H44 20-31	3816,34	3816,82
110	H44 65-75	3565,25	3565,61
111	H44 23-33	3526,24	3526,57
112	H44 92-103	3892,34	3892,71
113	H44 64-75	3880,36	3880,72
114	H44 89-101	4281,48	4282,08
115	H44 19-31	4155,46	4156,03
116	H44 20-31 89-101(N-Ac)	8228,83	8229,03
117	H44 63-74	3880,36	3880,21
118	H44 22-33	3841,35	3841,30

[Ejemplo de ensayo 1]

5 Ensayo in vitro

Utilizando un kit Amaxa Cell Line Nucleofector L en Nucleofector II (Lonza), se transfectaron de 0,1 a 30 μM de los oligómeros antisentido de la Tabla 1 con $3,5 \times 10^5$ células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano). Se utilizó el programa T-030.

10 Después de la transfección, las células se cultivaron durante tres noches en 2 mL de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (fabricado por Sigma, en lo sucesivo el mismo) que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 10% (fabricado por Invitrogen) en condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

15 Las células se lavaron una vez con PBS (fabricado por Nissui, en lo sucesivo el mismo) y se añadieron a las células 350 μL de tampón RLT (fabricado por Qiagen) que contenía 2-mercaptoetanol al 1% (fabricado por Nacalai Tesque). Después de dejar reposar las células a temperatura ambiente durante unos minutos para lisarlas, el producto lisado se recogió en un homogeneizador QIAshredder (fabricado por Qiagen). A continuación, el producto lisado se centrifugó a 15.000 rpm durante 2 minutos para preparar el producto homogeneizado. El ARN total se extrajo de acuerdo con el protocolo adjunto al kit RNeasy Mini Kit (fabricado por Qiagen). La concentración del ARN total extraído se determinó utilizando NanoDrop ND-1000 (fabricado por LMS).

25 La RT-PCR de una etapa se realizó con 400 ng del ARN total extraído utilizando un kit de RT-PCR QIAGEN OneStep (fabricado por Qiagen). Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se utilizó PTC-100 (fabricado por MJ Research) o TaKaRa PCR Thermal Dice Touch (fabricado por Takara Bio) como un termociclador. El programa de RT-PCR utilizado es el siguiente.

30 50°C, 30 minutos: reacción de transcripción inversa

95°C, 15 minutos: activación de la polimerasa, inactivación de la transcriptasa inversa, desnaturalización térmica del ADNc

[94°C, 30 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 1 min] x 35 ciclos: amplificación por PCR

72°C, 10 minutos: extensión final

Las secuencias de bases del cebador directo y el cebador inverso utilizados para la RT-PCR se proporcionan a continuación.

Cebador directo: 5'-GCTCAGGTCCGATTGACATT-3 '(SEQ ID NO: 125)

Cebador inverso: 5'-GGGCAACTCTTCCACAGTA-3 '(SEQ ID NO: 126)

45 El producto de reacción, 1 μL de la PCR anterior, se analizó utilizando Bioanalyzer (fabricado por Agilent Technologies, Inc.).

50 Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con omisión del exón 44 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin omisión del exón 44. Basándose en estos valores de medición de "A" y "B", se determinó la eficacia de omisión mediante la siguiente ecuación:

Eficacia de omisión (%) = $A/(A + B) \times 100$

Resultados experimentales

5 Los resultados se muestran en las FIG. 1 a 26. Este experimento reveló que el oligómero de la presente invención obtenido conectando oligómeros unitarios cortos seleccionados entre las bases -1^a a 44^a (SEQ ID NO: 1) y las bases 58^a a 115^a (SEQ ID NO: 2), respectivamente, desde el extremo 5' de la secuencia de nucleótidos del exón 44 (SEQ ID NO: 10) en el gen de la distrofina humana de tipo salvaje ocasiona la omisión del exón 44.

10 [Ejemplo de ensayo 2]

Ensayo in vitro

15 El experimento se llevó a cabo como en el EJEMPLO DE ENSAYO 1, excepto que se transfectaron $3,5 \times 10^5$ células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano) con los oligómeros de la presente invención de PMO Núm. 34, 100, 45, 73, 49 y 47 solos o mezclados, a una concentración de 1, 3, o 10 μM , utilizando un Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L en Nucleofector II (Lonza). Se utilizó el Programa T-030. Las combinaciones de las secuencias para la transfección son las siguientes.

20 Combinación de secuencias transfectadas

	Combinación de secuencias	Conc. de oligómero transfectado (μM)
1	PMO Núm. 34	1 μM
2	PMO Núm. 115 o PMO Núm. 114 o una mezcla	1 μM cada uno
3	PMO Núm. 100	1 μM
4	PMO Núm. 109 o PMO Núm. 114 o una mezcla	1 μM cada uno
5	PMO Núm. 45	1 μM
6	PMO Núm. 111 o PMO Núm. 110 o una mezcla	1 μM cada uno
7	PMO Núm. 73	1 μM
8	PMO Núm. 113 o PMO Núm. 112 o una mezcla	1 μM cada uno
9	PMO Núm. 49	1 μM
10	PMO Núm. 117 o PMO Núm. 118 o una mezcla	1 μM cada uno
11	PMO Núm. 47	3 o 10 μM
12	PMO Núm. 119 o PMO Núm. 120 o una mezcla	3 o 10 μM cada uno

Resultados experimentales

25 Los resultados se muestran en las FIG. 27 a 31. El experimento reveló que, cada uno de los PMO Núm. 110 a 115, PMO Núm. 117 y PMO Núm. 118 que se dirigían a un sitio en el exón 44 no podían ocasionar la omisión del exón 44 por sí mismos. Este experimento también reveló que, en comparación con las mezclas de dos ácidos nucleicos antisentido que se dirigían a diferentes sitios en el exón 44 (la mezcla de PMO Núm. 114 y PMO Núm. 115; la mezcla de PMO Núm. 109 y PMO Núm. 114; la mezcla de PMO Núm. 110 y PMO Núm. 111; la mezcla de PMO Núm. 112 y PMO Núm. 113; la mezcla de PMO Núm. 117 y PMO Núm. 118; y la mezcla de PMO Núm. 119 y PMO Núm. 120), los oligómeros de la presente invención de PMO Núm. 34, PMO Núm. 100, PMO Núm. 45, PMO Núm. 73, PMO Núm. 49 y PMO Núm. 47, donde los oligómeros unitarios correspondientes de cada uno están conectados entre sí, ocasionan la omisión del exón 44 con una elevada eficacia.

[Ejemplo de Ensayo 3]

Ensayo in vitro utilizando fibroblastos humanos

40 La actividad de omisión del exón 44 se determinó utilizando células GM05112 (fibroblastos derivados de pacientes con DMD humana con delección del exón 45, Coriell Institute for Medical Research). Como medio de crecimiento, se utilizó Medio de Eagle Modificado por Dulbecco: Mezcla de Nutrientes F-12 (DMEM/F-12) (Life Technologies) que contenía FCS al 10% (HyClone Laboratories, Inc.) y 1% de Penicilina/Estreptomicina (P/S) (Sigma -Aldrich, Inc.) y las células se cultivaron en condiciones de 37°C y 5% de CO₂.

45 Las células se cultivaron en matraces T225 y se añadieron 2,5 mL de retrovirus (coexpresión ZsGreen1) que expresaba myoD obtenida de seres humanos (SEQ ID NO: 127) y una concentración final de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de polibreno (Sigma Aldrich, Inc.) a 30 mL del medio de crecimiento. Después de una incubación a 32°C durante 2 días, el medio se cambió por un medio de crecimiento de nueva aportación y la incubación continuó

50

adicionalmente a 37°C durante 3 días. Se recogieron los fibroblastos con MyoD transformada positivos para ZsGreen1 por medio de BD FACSAria Cell Sorter (BD Bioscience). Las células recogidas se suspendieron en un medio de diferenciación (DMEM/F-12 que contenía suero equino al 2% (Life Technologies), 1% de P/S y Suplemento de Medios Líquidos ITS (Sigma-Aldrich, Inc.)) y se cultivaron en placa a $9,4 \times 10^4$ células/pocillo en una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno. El medio se cambió cada 2 a 3 días y la incubación continuó para diferenciarse en miotubos.

El día 7 después del cultivo en placa sobre la placa de 24 pocillos, el medio se reemplazó por un medio de diferenciación, y se añadieron 10 μ M de los oligómeros PMO Núm. 34, 45, 49 y 73 a la concentración final. Después de la incubación de las células durante 2 días, el medio se reemplazó por un medio de diferenciación sin PMO, y las células se incubaron cinco días más. A continuación, las células se recogieron para extraer el ARN total utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN). La RT-PCR se realizó con 50 ng del ARN total extraído utilizando un kit de RT-PCR QIAGEN OneStep. Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se utilizó un iCycler (fabricado por Bio-Rad Laboratories) como termociclador. El programa de RT-PCR utilizado es el siguiente.

50°C, 30 minutos: reacción de transcripción inversa

95°C, 15 minutos: activación de la polimerasa, inactivación de la transcriptasa inversa, desnaturalización térmica de ADNc

[94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min] x 35 ciclos: amplificación por PCR

72°C, 7 minutos: extensión final

Las secuencias de bases del cebador directo y el cebador inverso utilizados para la RT-PCR se proporcionan a continuación.

Cebador directo: 5'-GCTCAGGTCCGATTGACATT-3 '(SEQ ID NO: 125)

Cebador inverso: 5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3 '(SEQ ID NO: 126)

Se analizó 1 μ L del producto de la PCR por medio de Experion DNA 1K Analysis Kits (Bio-Rad Laboratories) utilizando Experion Electrophoresis Station (Bio-Rad Laboratories). Se seleccionó el ensayo de 1K de ADN en el Soporte Lógico de Experion versión 3.2 (Bio-Rad Laboratories) y se midió. Se determinaron el nivel de (A) de la banda alrededor de 317 pb y el nivel de (B) de la banda alrededor de 465 pb (unidad: nmoles/L). La eficacia de omisión (%) se determinó mediante la siguiente ecuación utilizando Excel 2007 SP3 (Microsoft).

Eficacia de omisión (%) = $A/(A + B) \times 100$

Resultados experimentales

Los resultados se muestran en la FIG. 32. Este experimento reveló que los oligómeros antisentido de la presente invención de PMO Núm. 34, 45, 49 y 73, podían ocasionar la omisión del exón 44 con una alta eficacia en células de un paciente con DMD sin delección del exón 45.

Aplicabilidad industrial

Los resultados experimentales en los Ejemplos de ensayo demuestran que los oligómeros de la presente invención en los que se conectan oligómeros cortos causan la omisión del exón 44 en células RD. Por lo tanto, los oligómeros de la presente invención son extremadamente útiles para el tratamiento de la DMD.

REIVINDICACIONES

1. Un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases, en donde

5 (a) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el Exón 44 del gen de la distrofina humana; y

10 (b) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el Exón 44 están conectadas, en donde el primer oligómero unitario está posicionado en el lado 3' del segundo oligómero unitario,

en donde la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se superponen entre sí,

15 en donde el oligómero antisentido induce la omisión del exón, y

20 en donde la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionadas de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionadas de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2,

25 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma, con la condición de que se excluyan los oligómeros antisentido que consisten en una cualquiera de una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 6, 7, 8 y 9.

2. El oligómero antisentido según la reivindicación 1, en donde la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionadas de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

30 3. El oligómero antisentido según la reivindicación 1, en donde la primera secuencia de nucleótidos o la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionadas de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

35 4. El oligómero antisentido según la reivindicación 1, en donde dos oligómeros unitarios seleccionados del grupo que consiste en los siguientes (c) a (e) están conectados:

40 (c) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 3;

45 (d) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 4; y

(e) un oligómero unitario que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 5,

50 o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma; en donde

(i) (c) está conectado a (d) o (e) con (c) posicionado en el lado 3'; o

55 (ii) (d) está conectado a (e) con (d) posicionado en el lado 3'.

5. El oligómero antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un oligonucleótido o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

60 6. El oligómero antisentido según la reivindicación 5, en donde el radical azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido se modifica, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables del mismo.

65 7. El oligómero antisentido según la reivindicación 5 o 6, en donde el radical azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo 2'-OH se reemplaza por uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en: OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br e I (en donde R es un alquilo o un arilo y R 'es un alquilenilo), o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptables

en donde el primer oligómero unitario está posicionado en el lado 3' del segundo oligómero unitario,

en donde la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se superponen entre sí, y

5

en donde la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2.

10

20. El método según la reivindicación 19, que comprende, además:

medir la eficacia de omisión por parte del oligómero antisentido obtenido; y

15

seleccionar un oligómero antisentido que tiene una eficacia de omisión que excede un valor de referencia.

21. Un método para la detección de un oligómero antisentido, que comprende:

20

(a) seleccionar

(i) un primer oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una primera secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el Exón 44 del gen de la distrofina humana; y

25

(ii) un segundo oligómero unitario que comprende una secuencia de nucleótidos complementaria a una segunda secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas en el Exón 44,

en donde el primer oligómero unitario está situado en el lado 3' del segundo oligómero unitario,

30

en donde la primera secuencia de nucleótidos y la segunda secuencia de nucleótidos no son consecutivas ni se superponen entre sí, y

en el que la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, y la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2;

35

(b) conectar los oligómeros unitarios primero y segundo para producir un oligómero antisentido que tiene una longitud de 15 a 30 bases;

40

(c) medir la eficacia de omisión del oligómero antisentido obtenido en la etapa (b); y

(d) seleccionar un oligómero antisentido que tiene una eficacia de omisión que excede un valor de referencia

45

con la condición de que los estén excluidos oligómeros antisentido que consisten en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de un grupo que consiste en las SEQ ID Nos: 6, 7, 8 y 9.

50

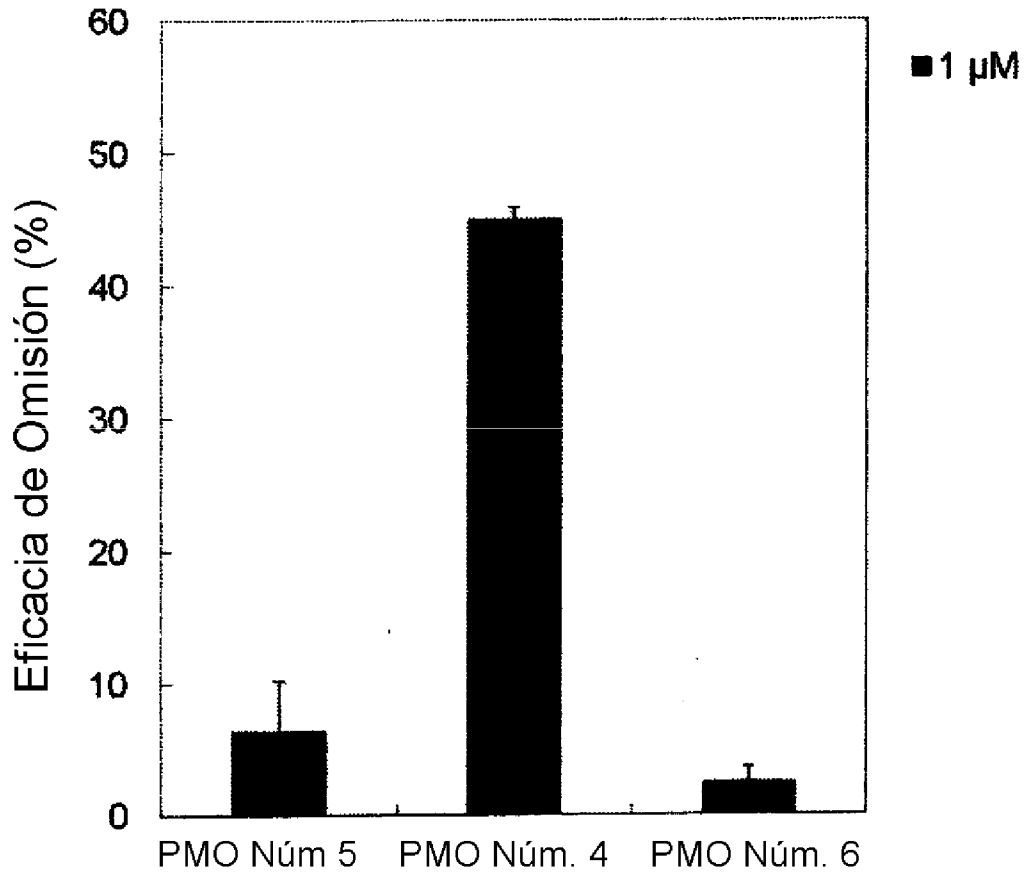
22. El oligómero antisentido según la reivindicación 1, en donde la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 1 y la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

55

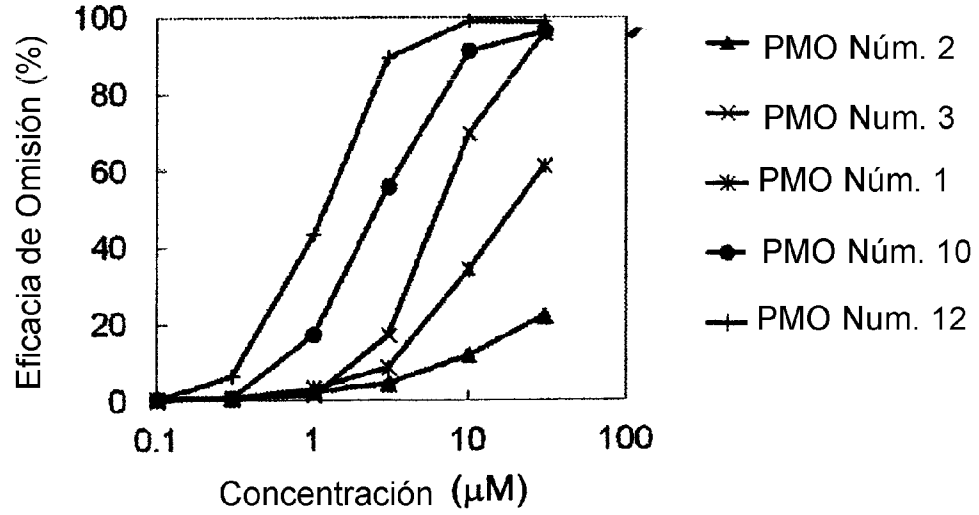
23. El oligómero antisentido según la reivindicación 1, en donde la primera secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2 y la segunda secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos de 7 a 15 bases consecutivas seleccionada de la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 2, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de la misma.

DIBUJOS

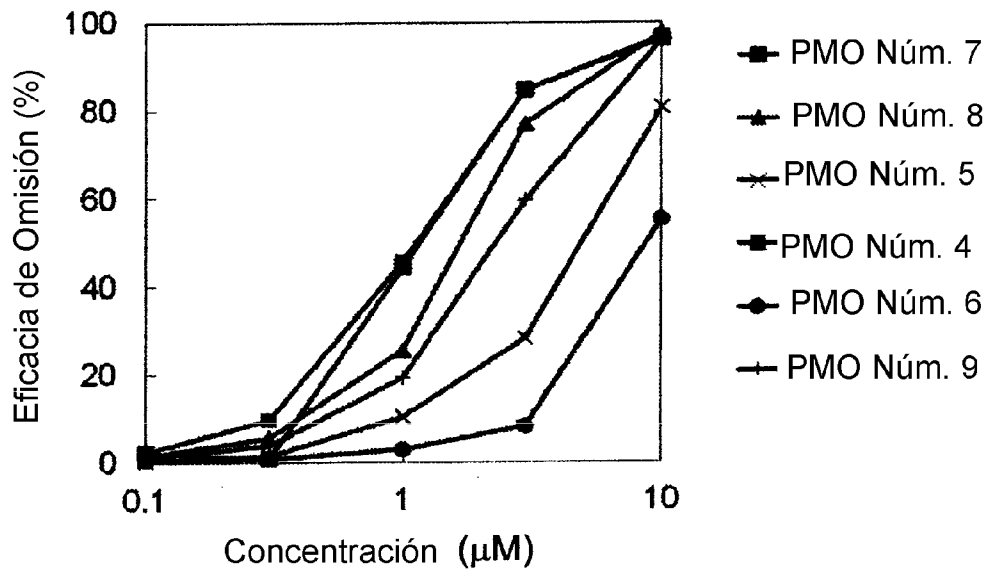
[FIG. 1]



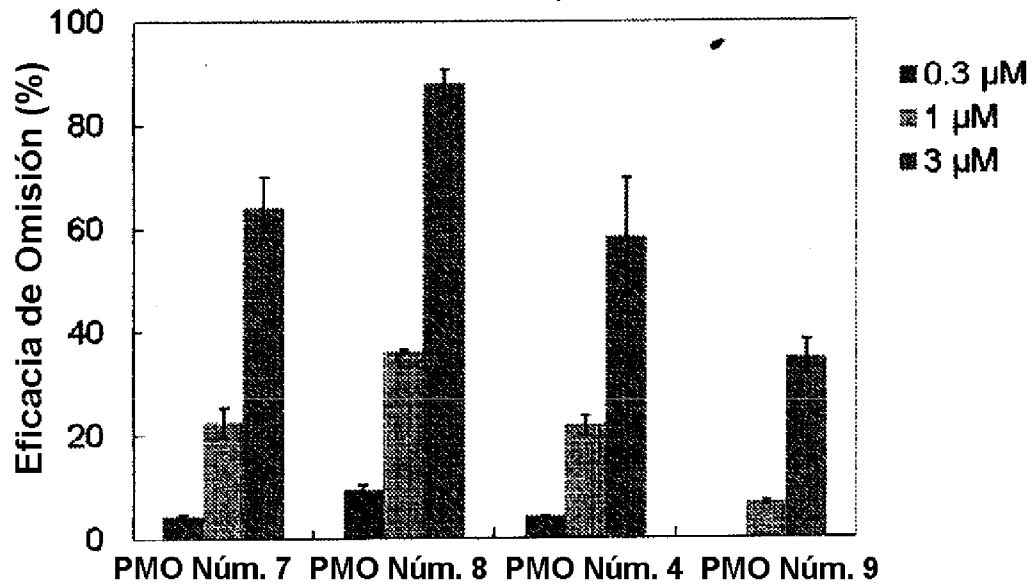
[FIG. 2]



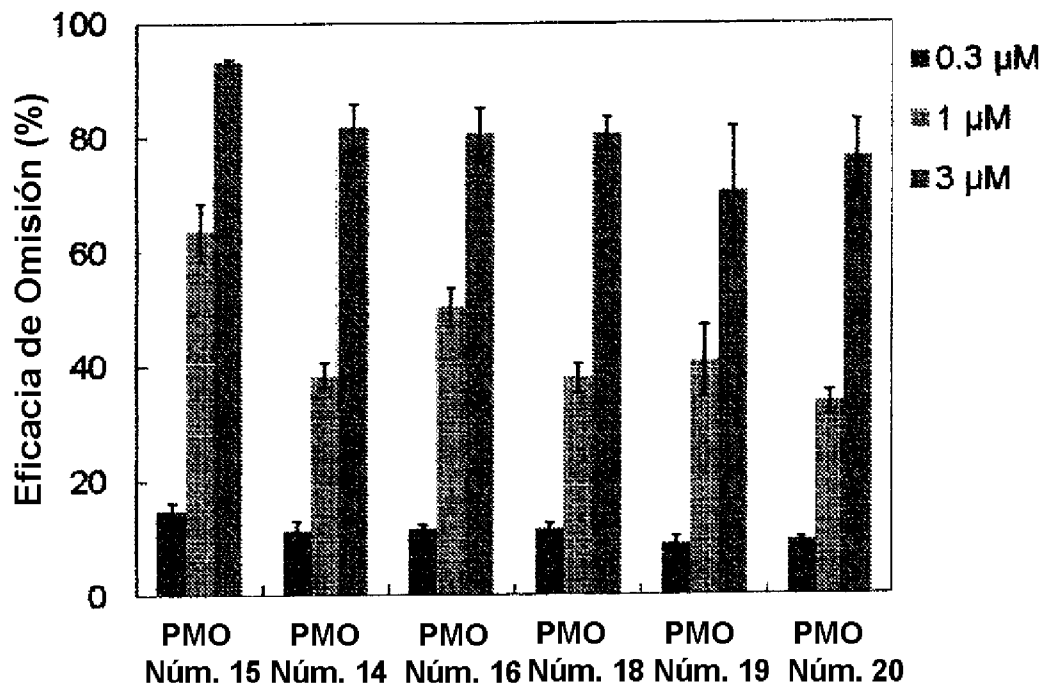
[FIG. 3]



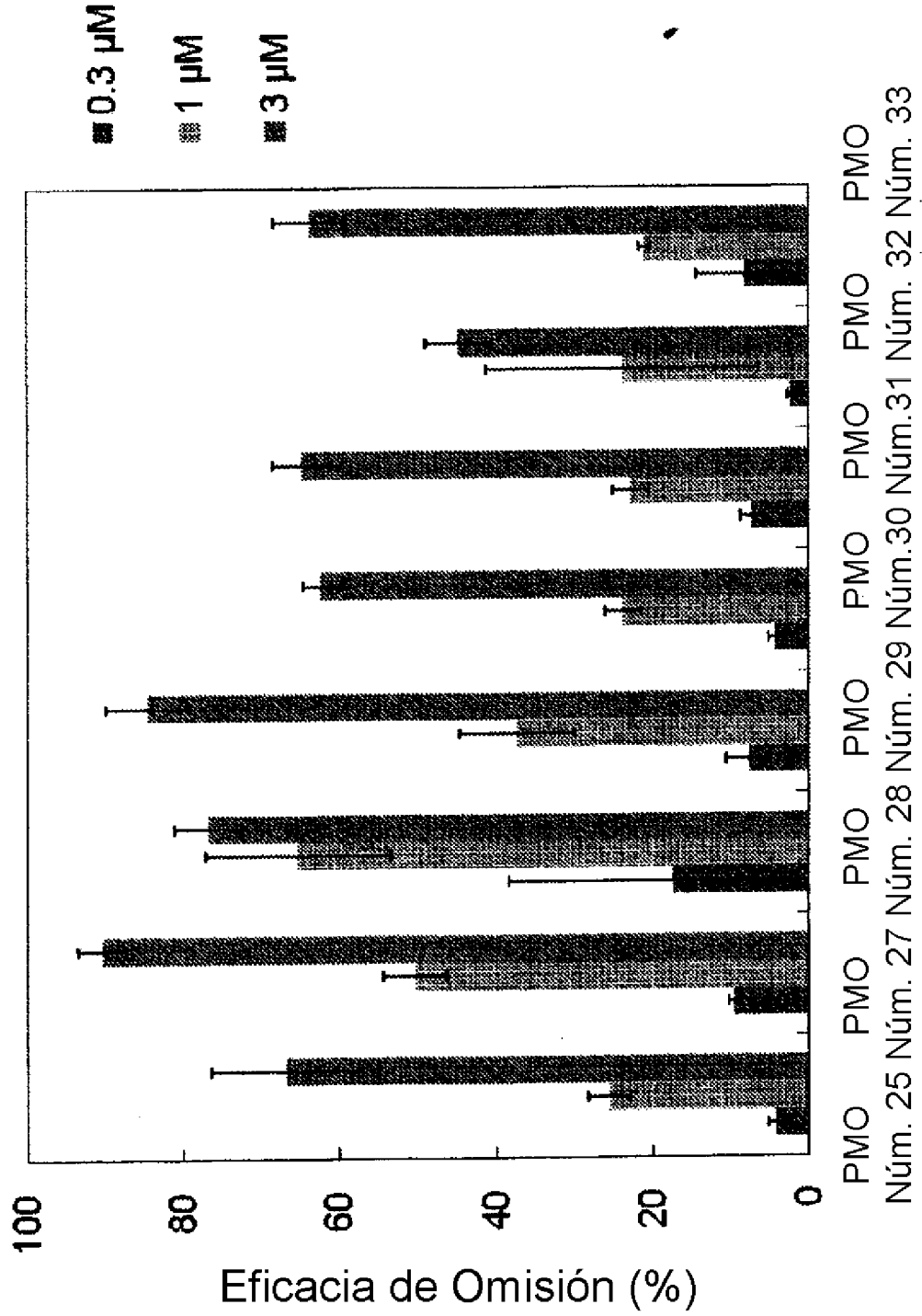
[FIG. 4]



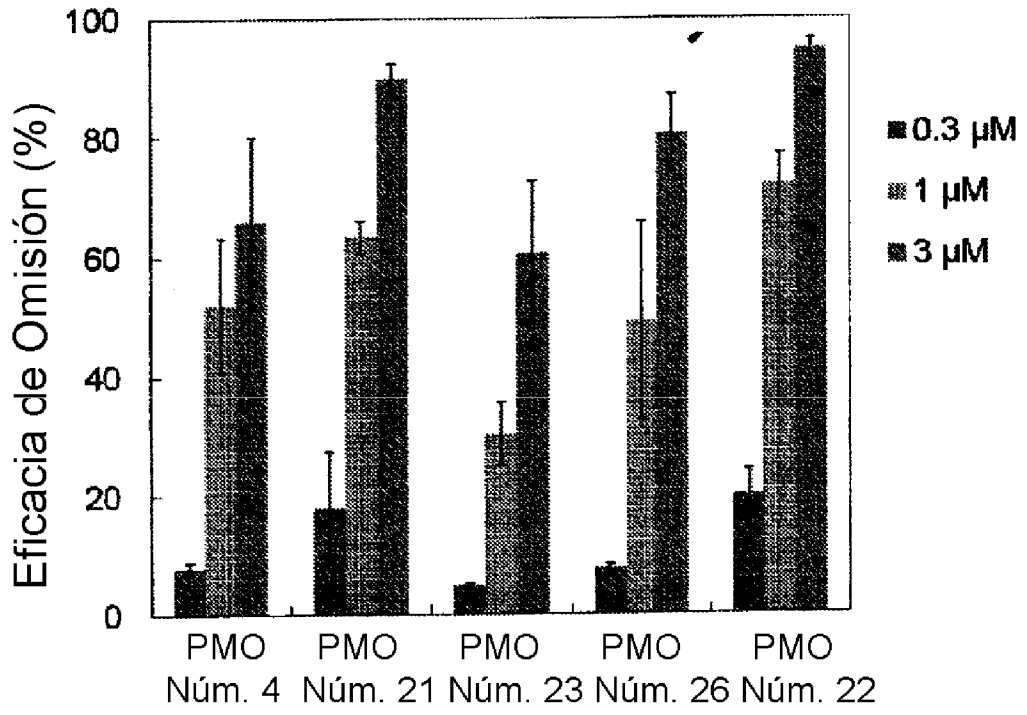
[FIG. 5]



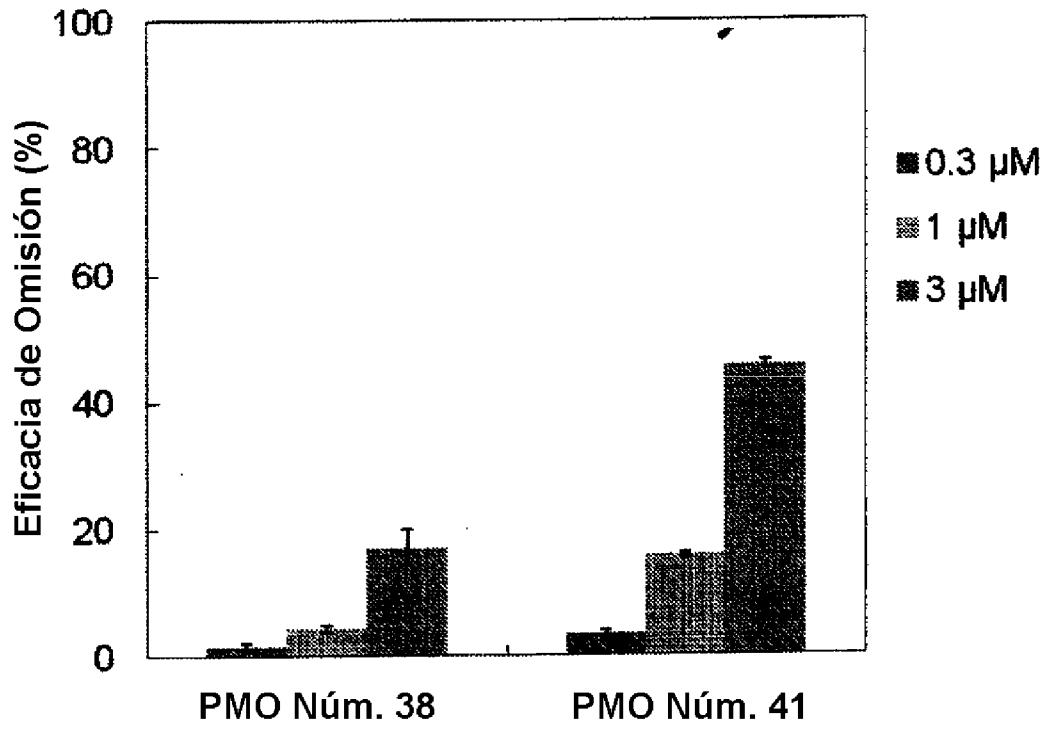
[FIG. 6]



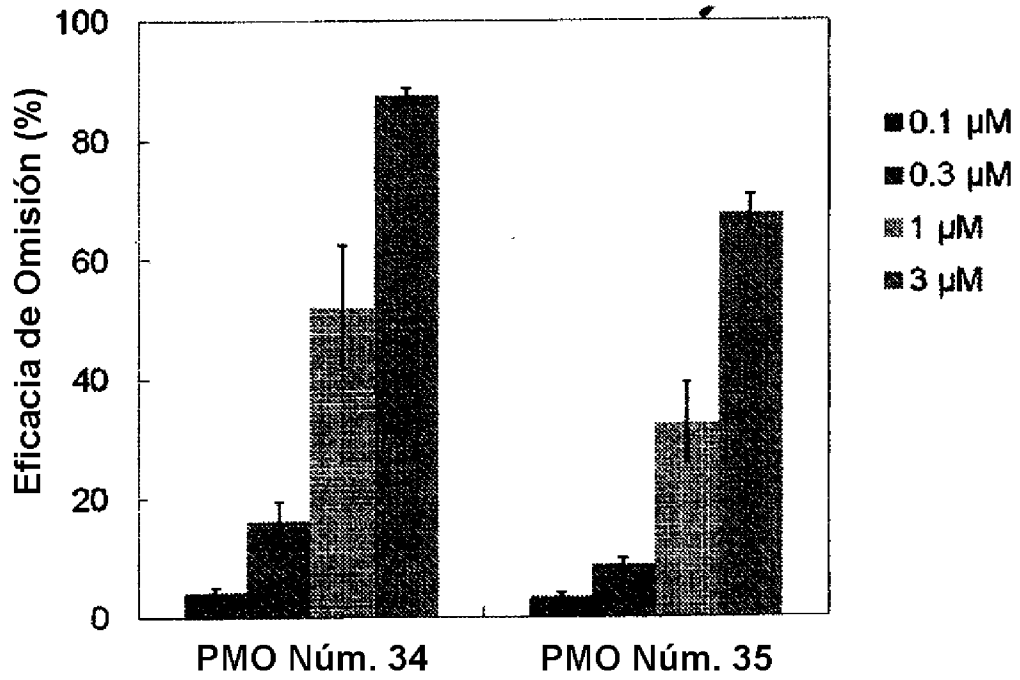
[FIG. 7]



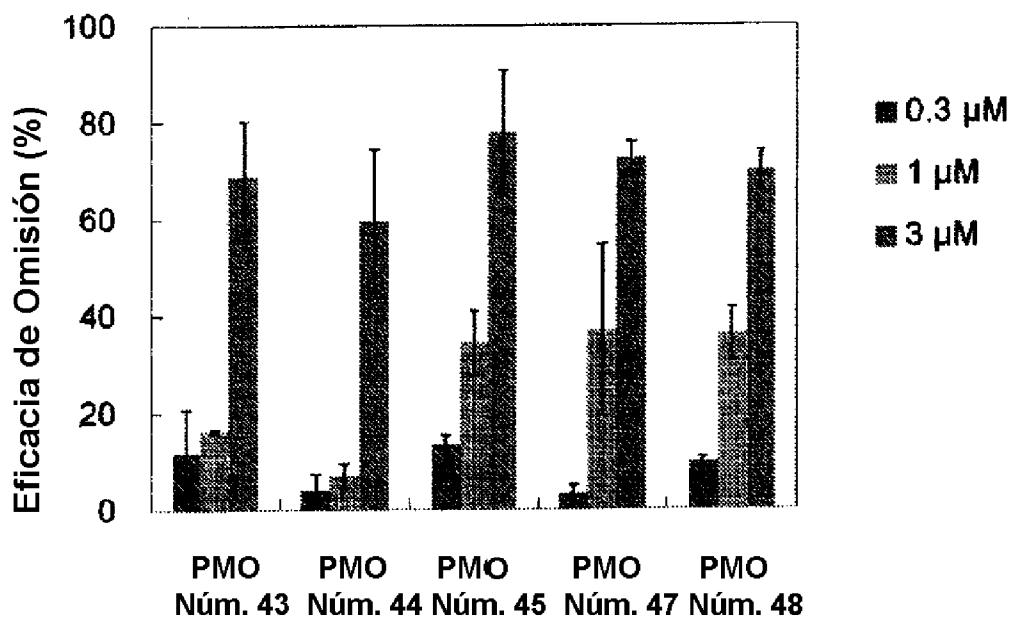
[FIG. 8]



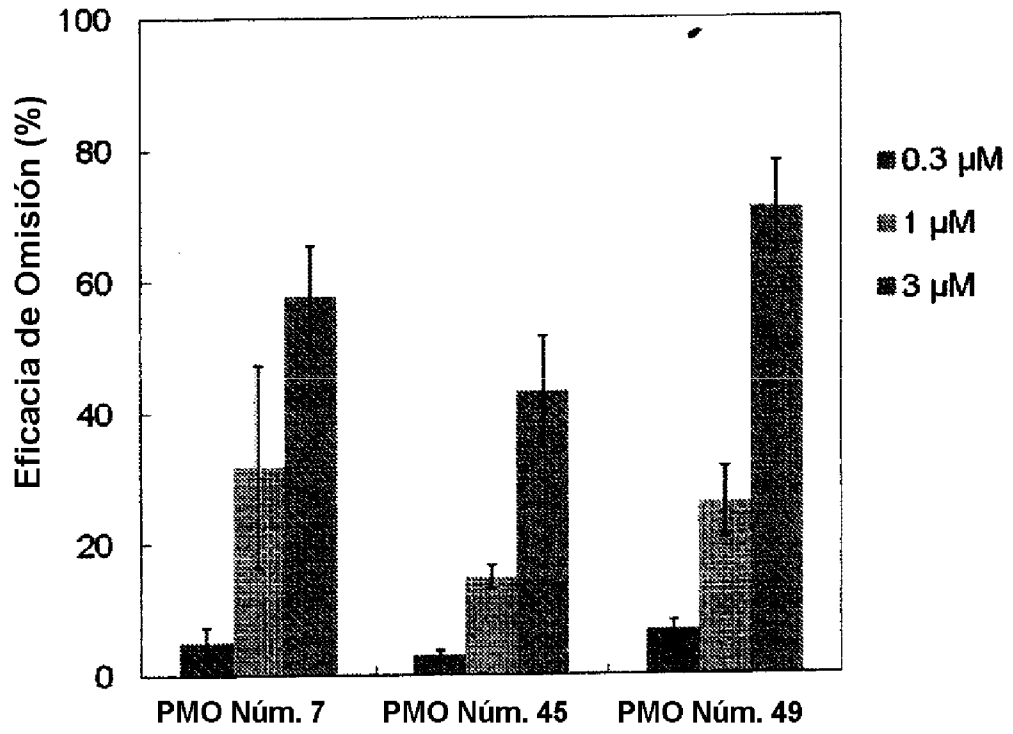
[FIG. 9]



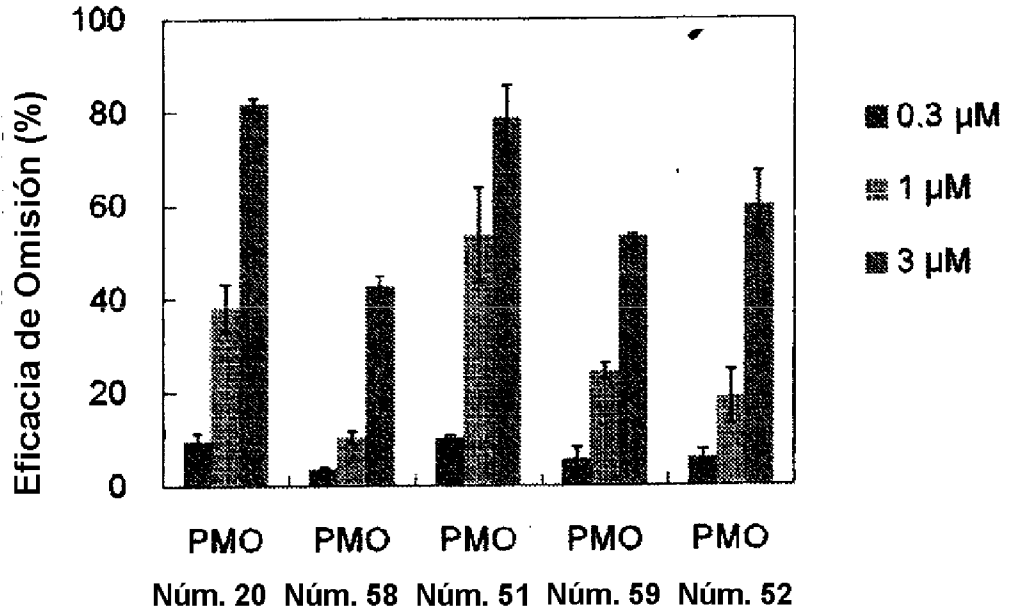
[FIG. 10]



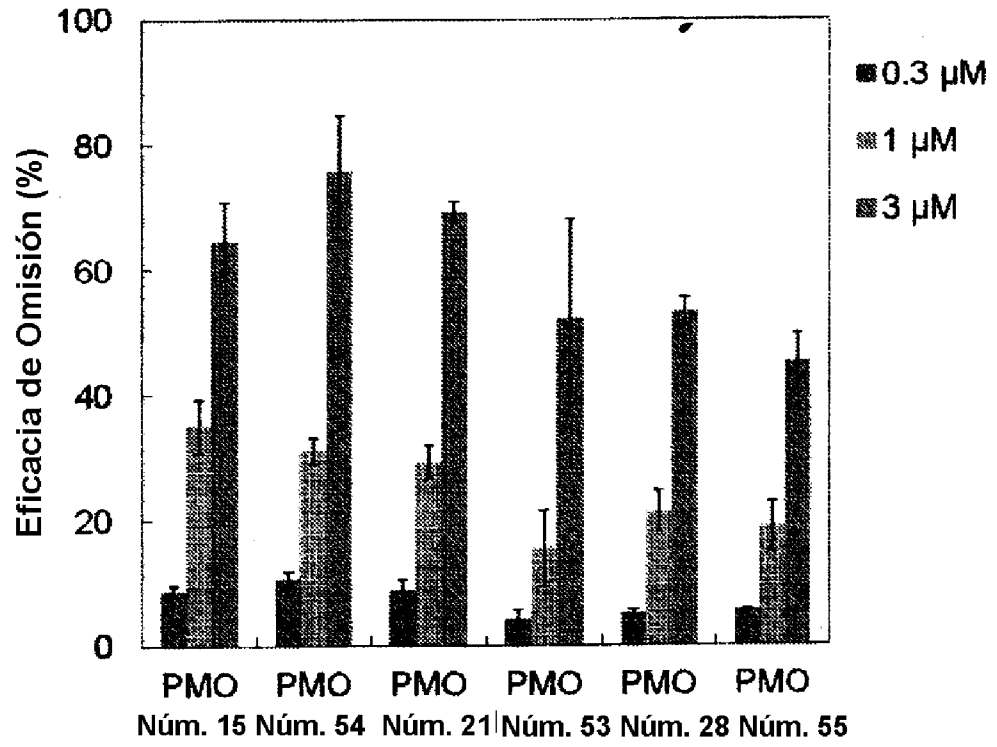
[FIG. 11]



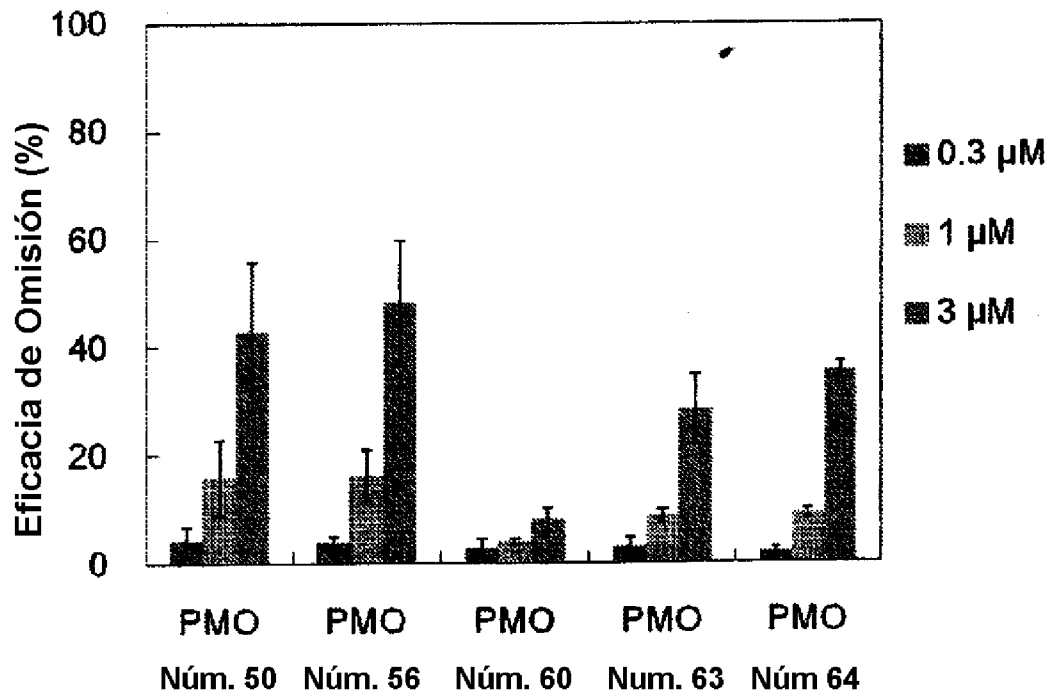
[FIG. 12]



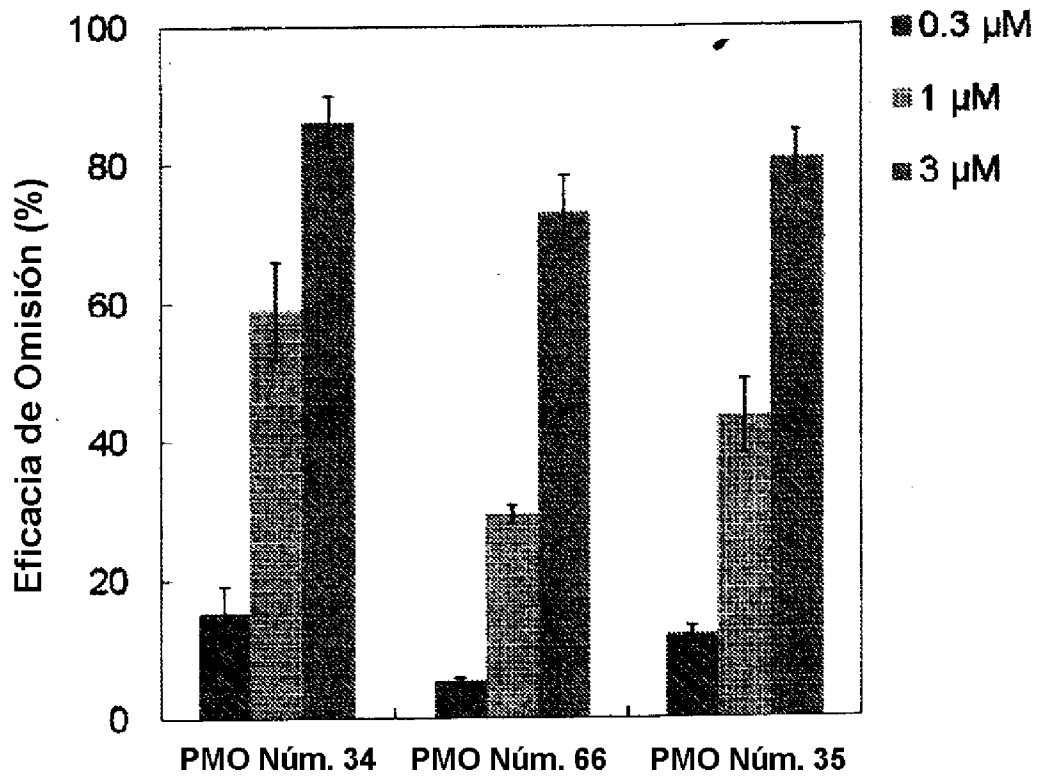
[FIG. 13]



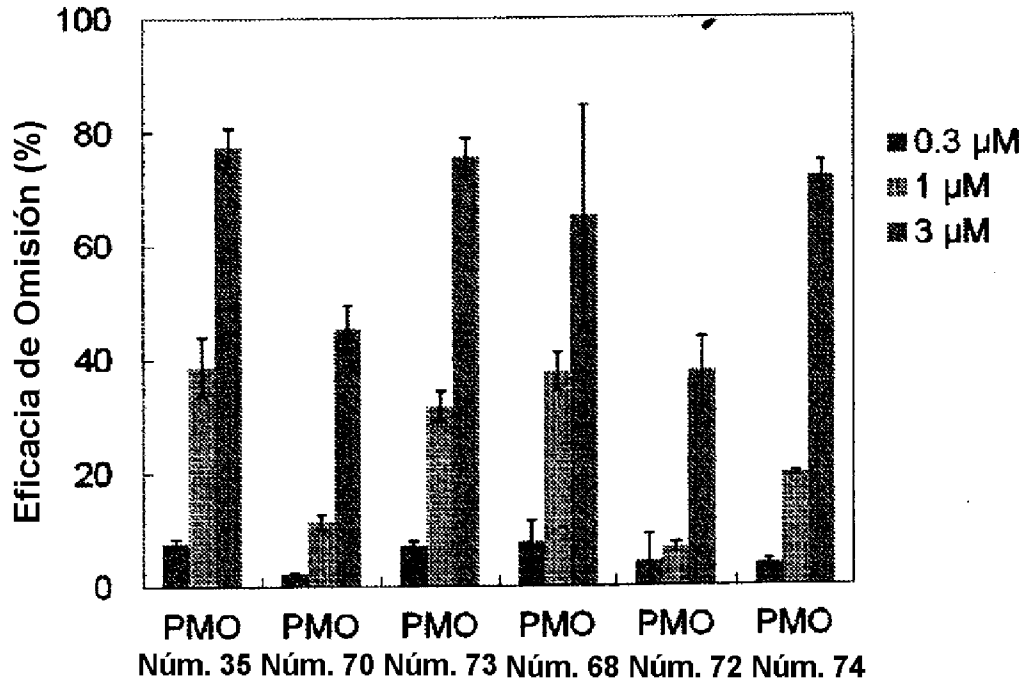
[FIG. 14]



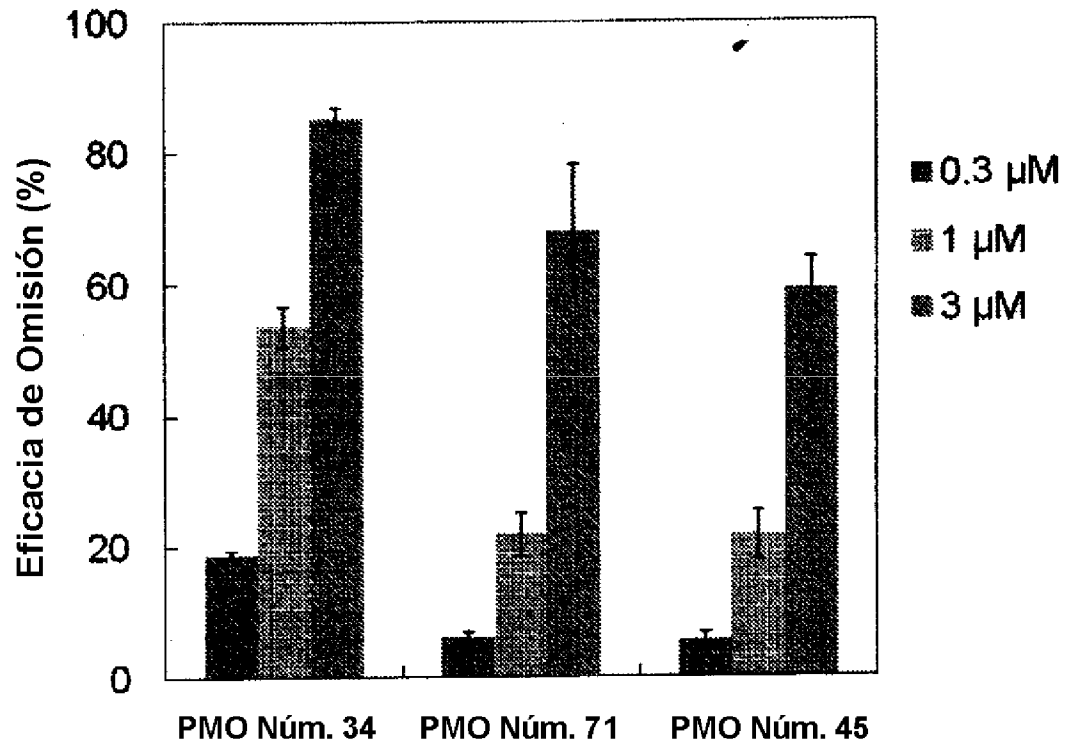
[FIG. 15]



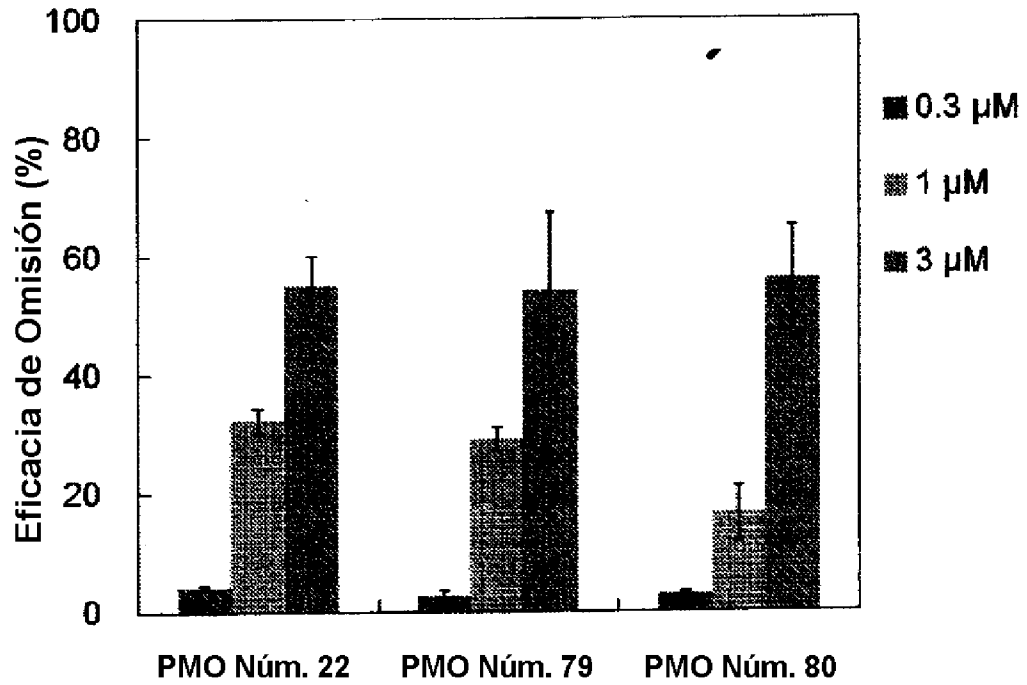
[FIG. 16]



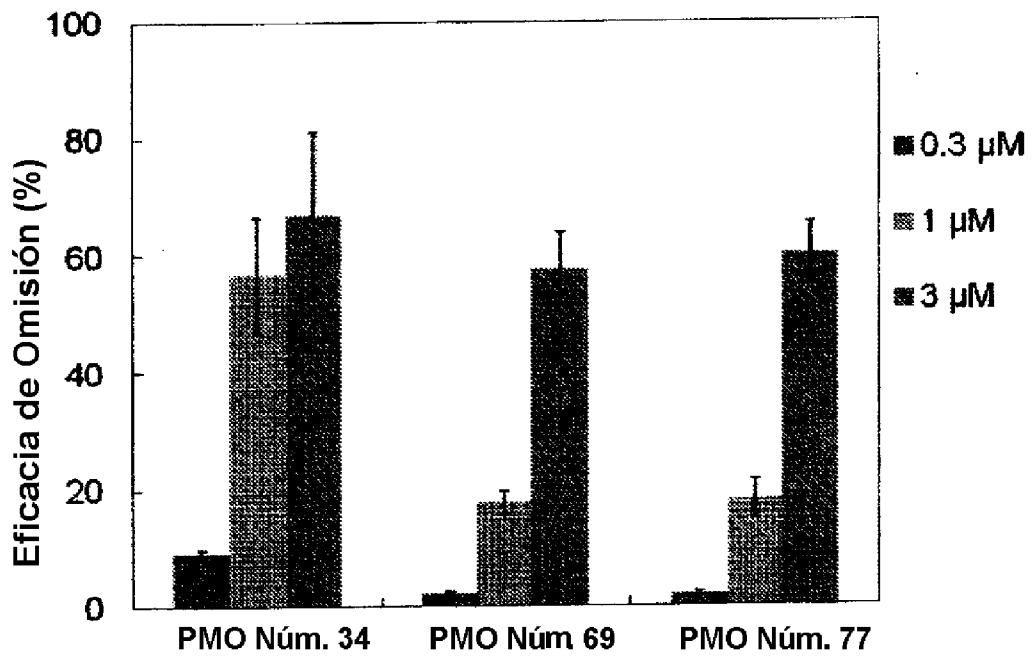
[FIG. 17]



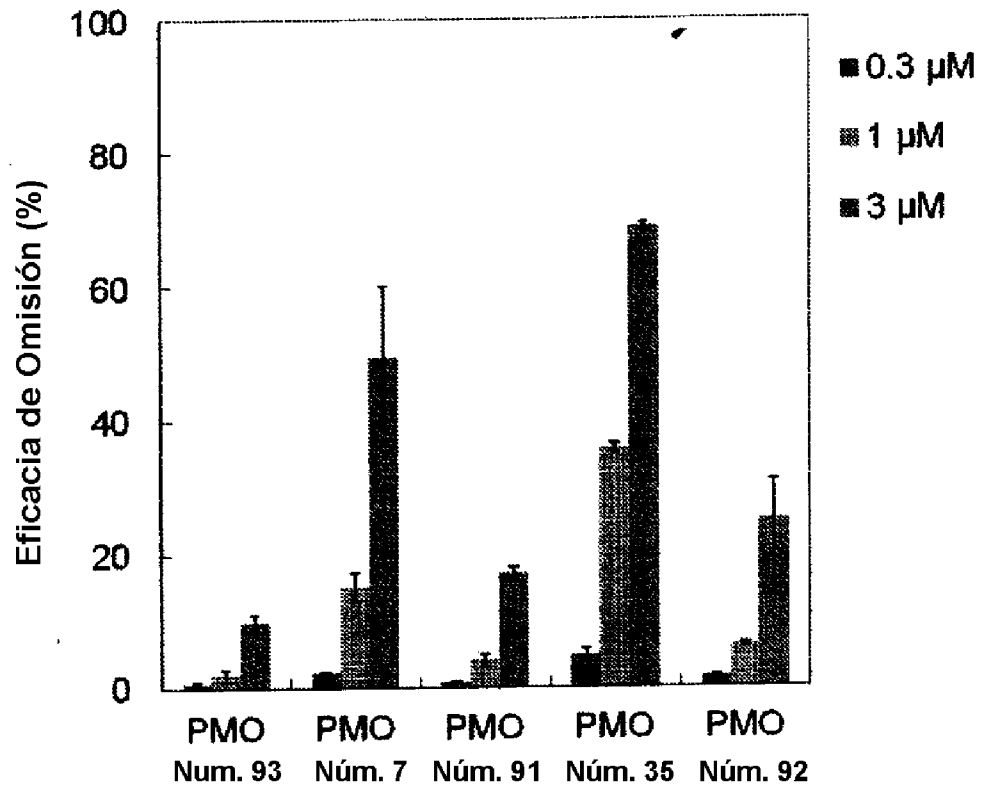
[FIG. 18]



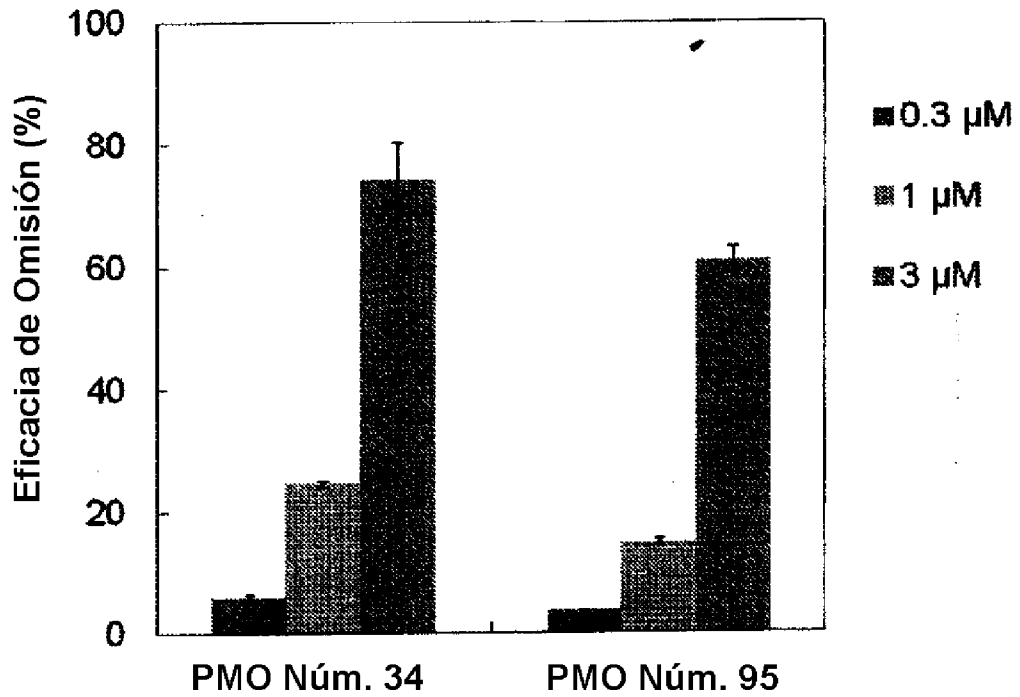
[FIG. 19]



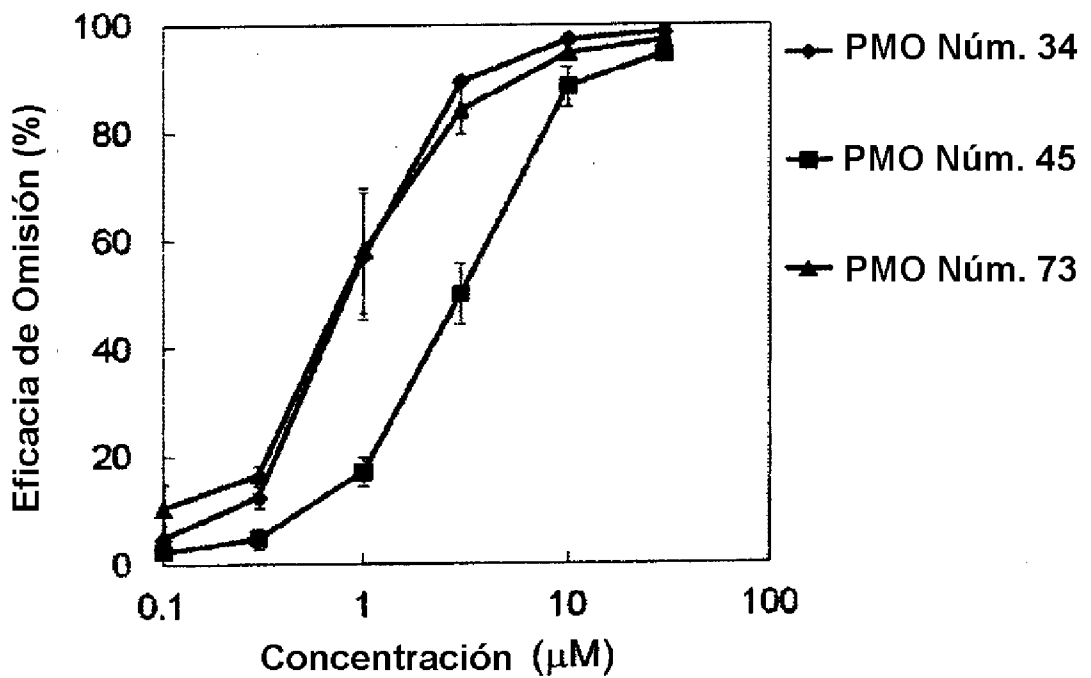
[FIG. 20]



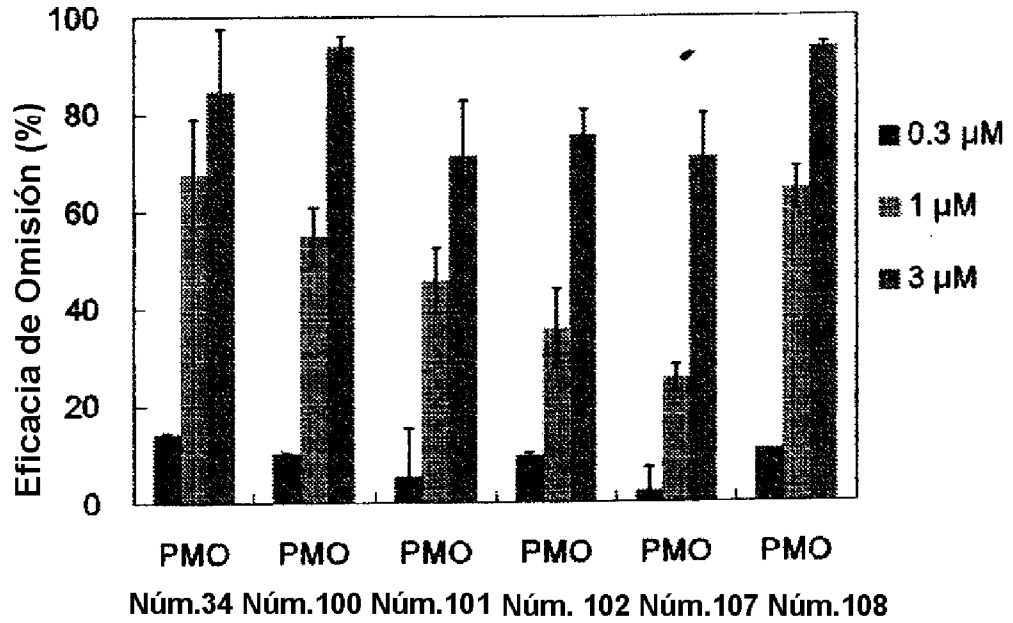
[FIG. 21]



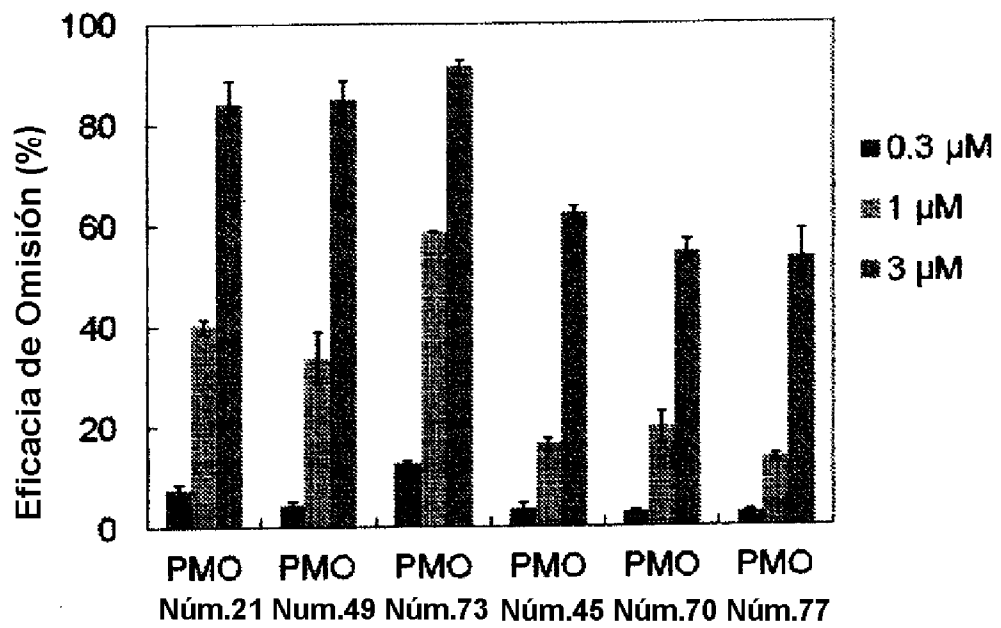
[FIG. 22]



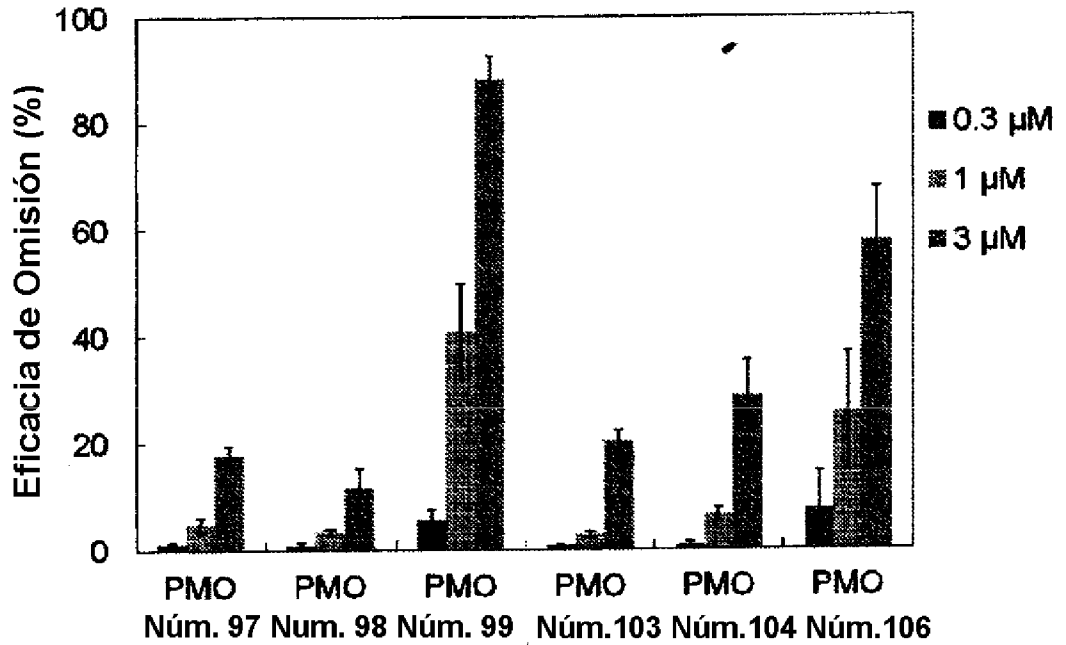
[FIG. 23]



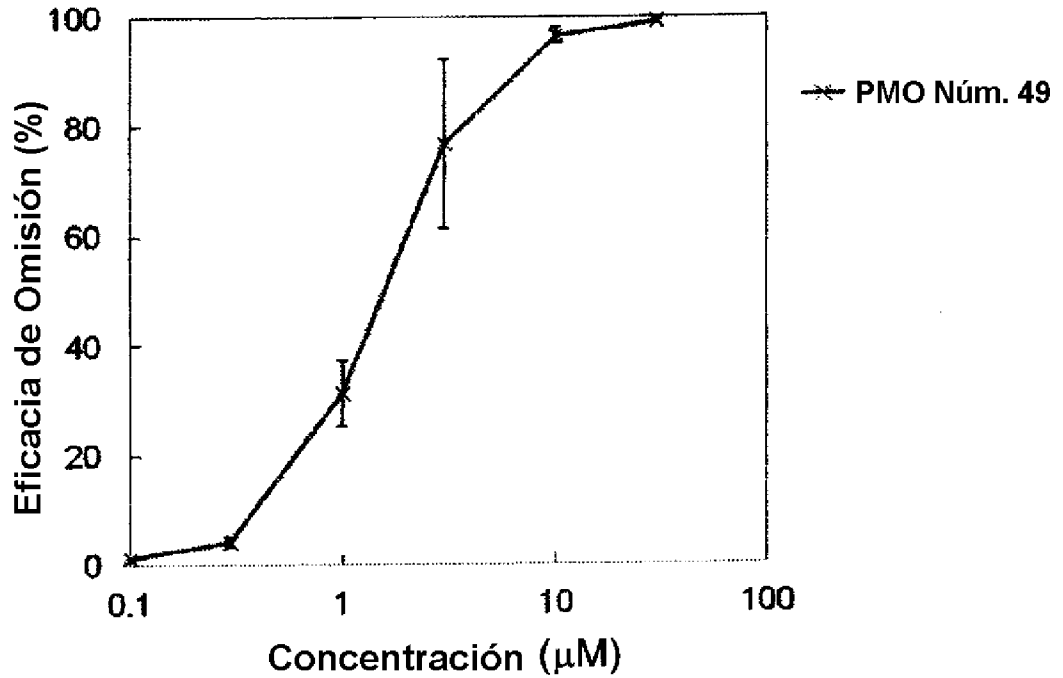
[FIG. 24]



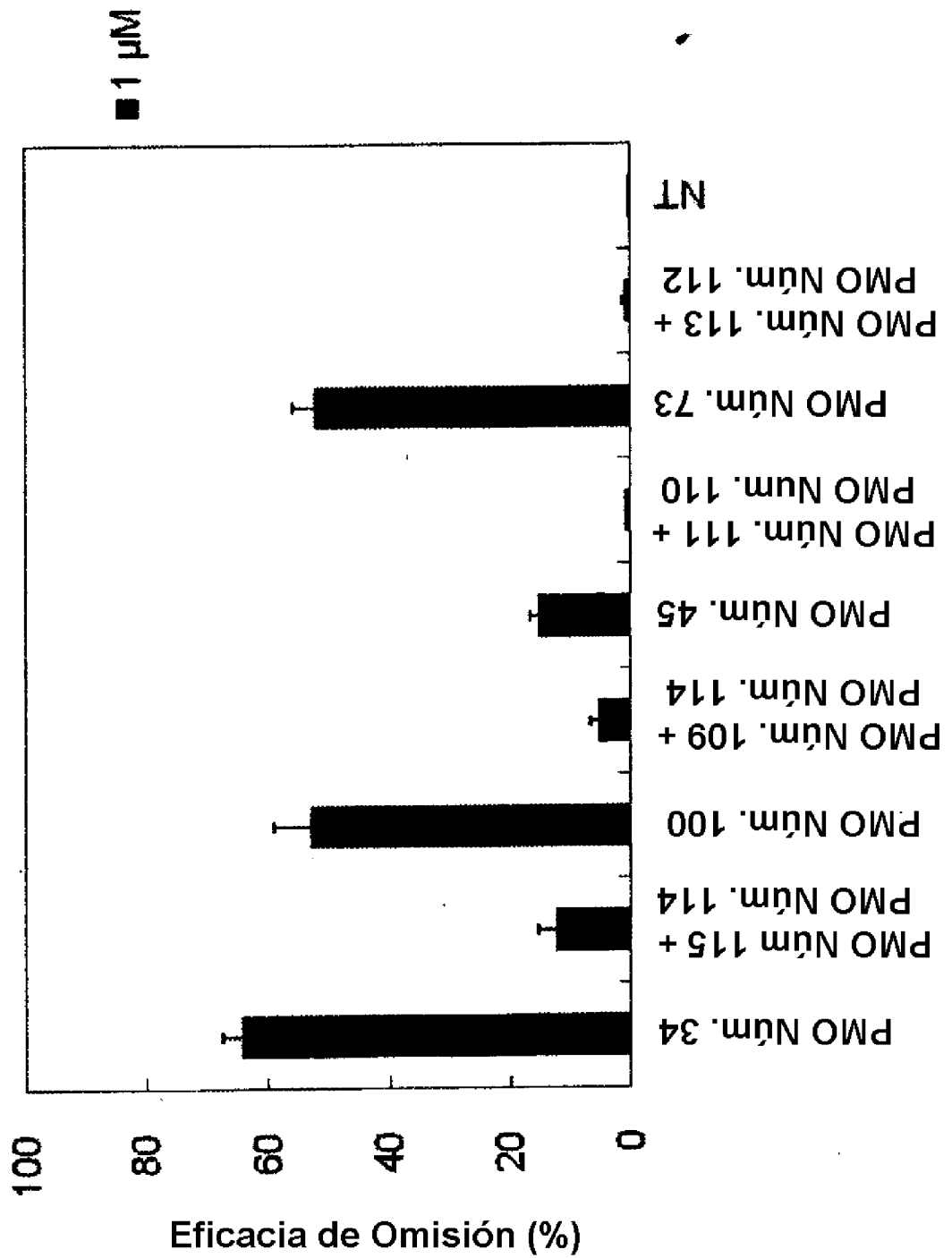
[FIG. 25]



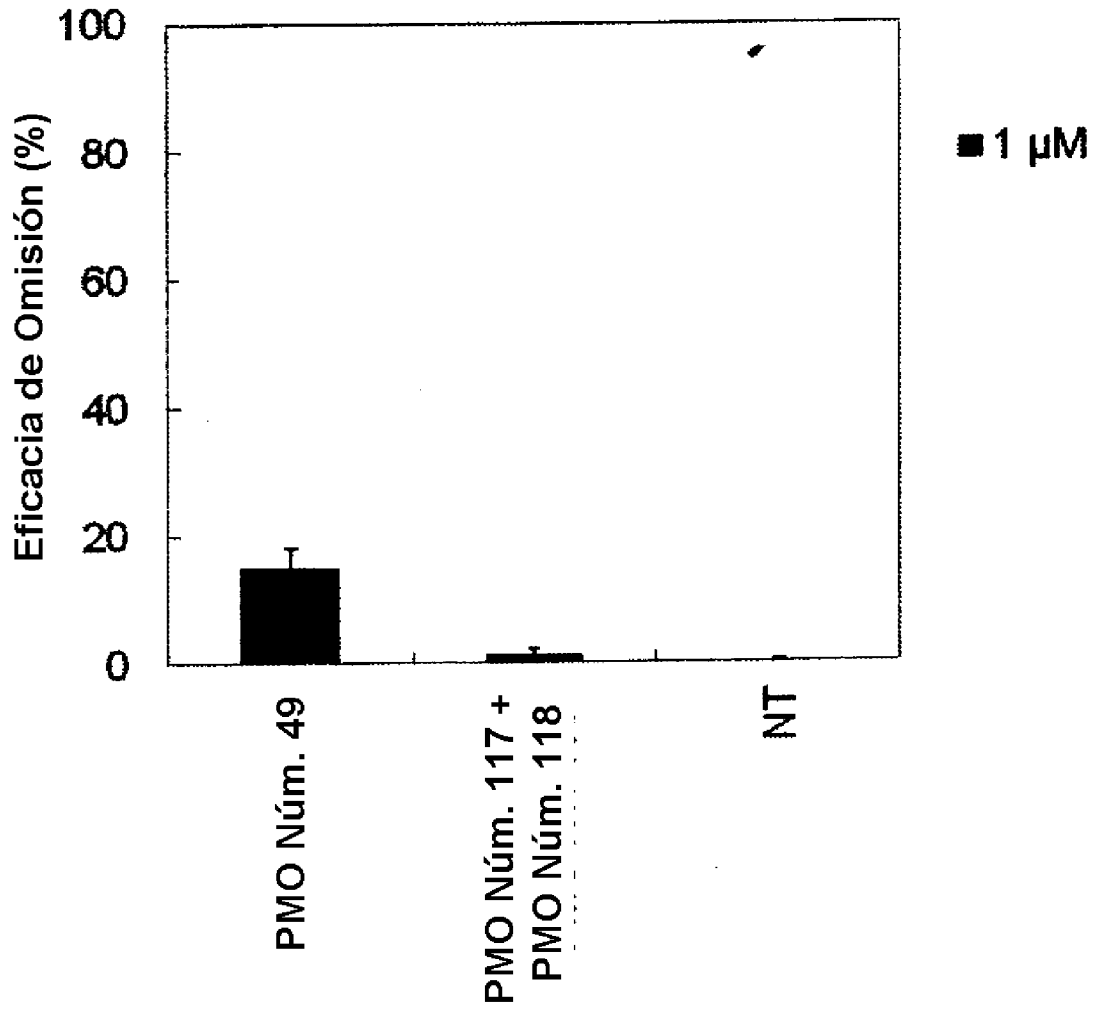
[FIG. 26]



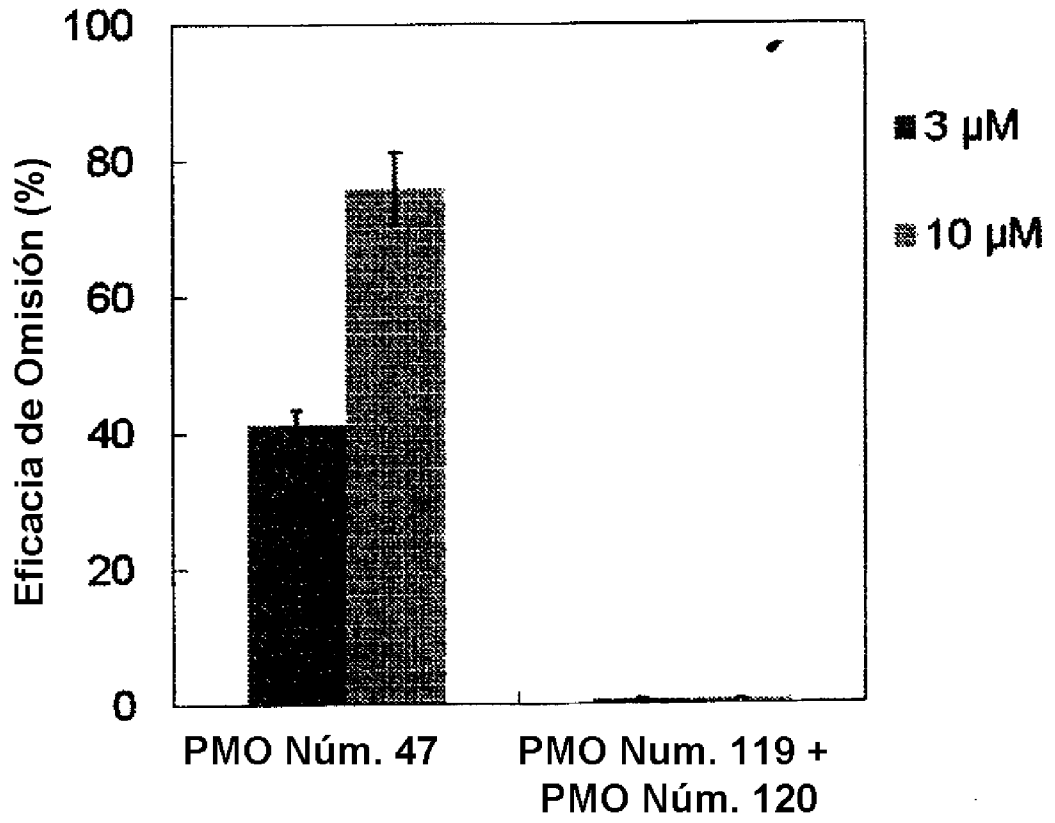
[FIG. 27]



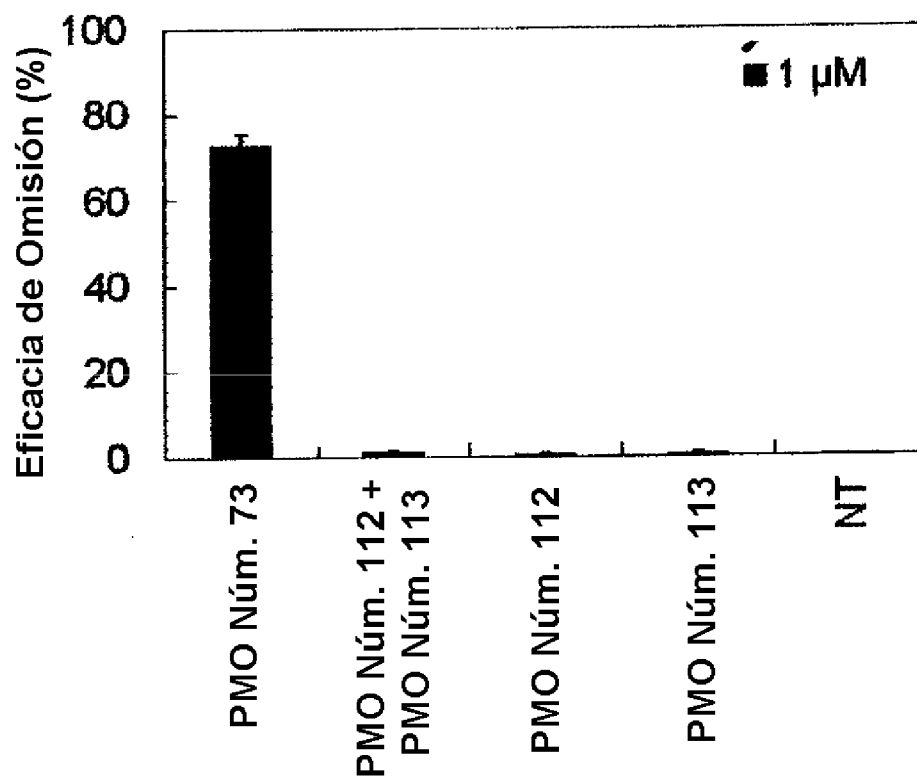
[FIG. 28]



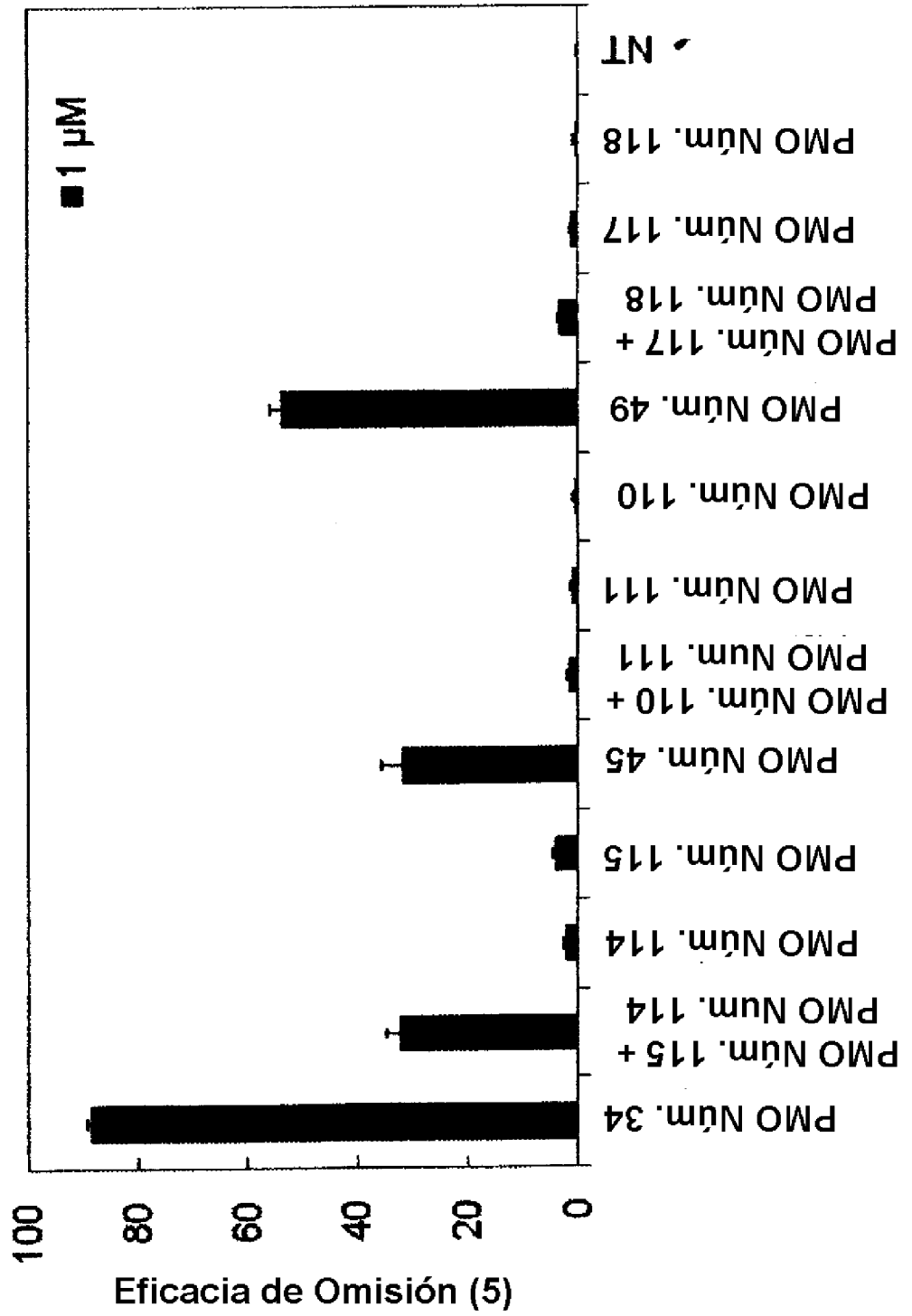
[FIG. 29]



[FIG. 30]



[FIG. 31]



[FIG. 32]

