(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 509 140**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11	(2006.01)
C07H 21/04	(2006.01)
A61K 31/7088	(2006.01)
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: **21.11.2003** **E 09011130 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014** **EP 2135948**

(54) Título: **Fármacos de ácido nucleico ENA que modifican el corte y empalme en precursores de ARNm**

(30) Prioridad:

25.11.2002 JP 2002340857
31.07.2003 JP 2003204381

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2014

(73) Titular/es:

MATSUO, MASAFUMI (25.0%)
Department of Medical Rehabilitation, Faculty of Rehabilitation Kobegakuin University, 518 Arise, Ikawadani-cho, Nishi-ku, Kobe-shi
Hyogo 651-2180, JP;
ORPHAN DISEASE TREATMENT INSTITUTE CO., LTD. (25.0%);
TAKESHIMA, YASUHIRO (25.0%) y
DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (25.0%)

(72) Inventor/es:

MATSUO, MASAFUMI;
TAKESHIMA, YASUHIRO y
KOIZUMI, MAKOTO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 509 140 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

Fármacos de ácido nucleico ENA que modifican el corte y empalme en precursores de ARNm

Campo técnico

La presente invención se refiere a agentes farmacéuticos de ácido nucleico ENA capaces de modificar el corte y empalme de precursores de ARNm. Más específicamente, la presente invención se refiere a compuestos de oligonucleótido antisentido para secuencias potenciadoras del corte y empalme en el exón 45 del gen de la distrofina, así como agentes terapéuticos para la distrofia muscular que comprenden los compuestos.

Técnica antecedente

La distrofia muscular, que es una enfermedad muscular genética, se clasifica de forma aproximada en distrofia muscular de Duchenne (DMD) y distrofia muscular de Becker (BMD). La DMD es la enfermedad muscular genética que aparece más frecuentemente y sucede en una proporción de 1 por 3.500 nacimientos de varones. Los pacientes de DMD muestran síntomas de debilitación de los músculos en su niñez; después de ello, la atrofia muscular progresa de forma constante y provoca la muerte a la edad de aproximadamente 20. Actualmente, no existe agente terapéutico eficaz para DMD. El desarrollo de agentes terapéuticos está fuertemente demandado por pacientes con DMD en todo el mundo. La BMD en muchos casos sucede en la adultez y la mayoría de los pacientes son capaces de una supervivencia normal aunque se observa ligera debilitación de los músculos. Se han identificado mutaciones de deleciones en el gen de la distrofina en 2/3 casos de DMD y BMD. El progreso de los síntomas clínicos en pacientes con DMD o BMD es predecible dependiendo de si dichas deleciones alteran la fase de lectura traduccional del ARNm o mantienen esa fase de lectura (Monaco A.P. et al., Genomics 1988: 2:90-95). Aunque la biología molecular para comprender la DMD se ha profundizado de este modo, aún no se ha establecido un método eficaz para tratar la DMD.

Cuando los pacientes de DMD tienen una mutación de desplazamiento de fase, la proteína distrofina desaparece completamente de los músculos esqueléticos de los pacientes. Por otro lado, la proteína distrofina se produce a partir de ARNm en fase en tejidos musculares derivados de pacientes con BMD, aunque la proteína está incompleta. Como método para tratar la DMD, se conoce un método en que una mutación fuera de fase (la fase de lectura de aminoácidos está desplazada) se convierte en una mutación en fase (la fase de lectura se mantiene) modificando el ARNm de la distrofina (Matsuo M., Brain Dev 1996; 18:167-172). Recientemente, se ha informado de que el ratón mdx sintetizaba una distrofina que contiene deleción como resultado de la inducción de salto de exón con un oligonucleótido complementario a la secuencia consenso de corte y empalme del gen de la distrofina (Wilton S.D. et al., Neuromusc Disord 1999: 9:330-338; Mann C.J. et al., Proc Natl Acad Sci USA 2001: 98:42-47). En estos estudios, el salto de exón se induce usando como diana la secuencia consenso de corte y empalme localizada en el límite entre dos exones.

Se asevera que el corte y empalme está regulado por secuencias potenciadoras de corte y empalme (SES). De hecho, se ha demostrado que alterando las SES en el exón 19 del gen de la distrofina con un oligonucleótido antisentido complementario al mismo, sucede un salto completo del exón 19 en células linfoblastoides normales (Takeshima Y et al., J Clin Invest 1995: 95:515-520; Pramono Z.A. et al., Biochem Biophys Res Commun 1996: 226:445-449).

También se ha informado de que introduciendo un oligonucleótido complementario a la SES en el exón 19 del gen de la distrofina para inducir de este modo el salto de exón, se producía satisfactoriamente una distrofina que contiene deleción en células musculares derivadas de pacientes con DMD que portan deleción del exón 20 (Takeshima Y et al., Brain & Development 2001: 23:788-790; publicación de patente japonesa no examinada Nº H11-140930; publicación de patente japonesa no examinada Nº 2002-10790). Esto indica que reparando el desplazamiento de la fase de lectura induciendo un salto del exón 19 con un oligonucleótido antisentido complementario a la SES en el exón 19 del gen de la distrofina se provoca la producción de una proteína distrofina cuya función está parcialmente restaurada; y por tanto es posible cambiar de DMD a BMD. Si es posible convertir la DMD, una miostrofia grave, en BMD ligera, puede esperarse prolongar las vidas de los pacientes.

Actualmente, se están desarrollando análogos oligonucleotídicos que tienen actividad antisentido estable y excelente (publicación de patente japonesa no examinada Nº 2000-297097).

Aartsma-Rus et al. (Neuromuscular Disorders (2002) 12-S71-S77) analizan terapias de corrección génica dirigidas a la restauración de la fase de lectura en pacientes con distrofia muscular de Duchenne. Aartsma-Rus *et al.* informan de que oligonucleótidos antisentido podrían inducir el salto de 11 exones de distrofia muscular de Duchenne en células musculares humanas cultivadas. El documento WO 2004/083446 describe métodos para generar oligonucleótidos con que puede saltarse un exón en un pre-ARNm y por tanto para excluirse de un ARNm producido del mismo.

El documento EP-A-1 191 098 describe un ADN que representa la secuencia potenciadora de corte y empalme (SES) en el exón 45 del gen humano de la distrofina, y sugiere que este ADN sirve como molde en la preparación del oligonucleótido antisentido, que puede usarse para inducir el salto del exón 45 para restaurar la fase de lectura del ARNm de la distrofina.

Un objeto de la presente invención es proporcionar agentes terapéuticos con rango de aplicación más amplio y mayor eficacia, mejorando los oligonucleótidos antisentido para la SES en el exón 45 del gen de la distrofina.

Descripción de la invención

Como resultado de investigaciones extensivas e intensivas hacia la consecución del objeto descrito anteriormente, los presentes inventores han conseguido diseñar y sintetizar esas secuencias de nucleótidos y compuestos de oligonucleótido antisentido que tienen mayor efecto de salto de exón sobre el exón 45 del gen de la distrofina. Por tanto, la presente invención se ha conseguido.

La presente invención puede resumirse del siguiente modo.

[1] Un compuesto oligonucleotídico capaz de inducir el salto del exón 45 del gen de la distrofina, que es un oligonucleótido representado por la secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de las SEC ID Nº 15, 14 y 16 donde al menos uno de los nucleósidos que constituyen el oligonucleótido está modificado 2'-O, 4'-C alquilenación de D-ribofuranosa o un compuesto representado por la fórmula general (III'); o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, opcionalmente donde al menos uno de los azúcares y/o los fosfatos que constituyen el oligonucleótido está modificado, donde dicha fórmula general (III') se define del siguiente modo:

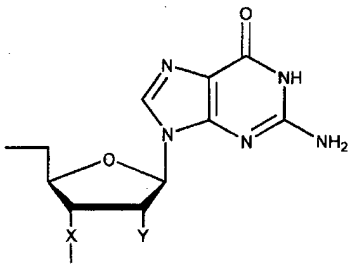
$$B_{T'3}\text{-}B_{M'3}\text{-}B_{B'3} \qquad \text{(III')}$$

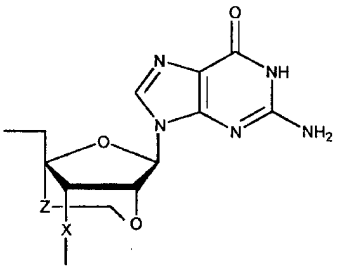
donde $B_{T'3}$ es un grupo representado por uno cualquiera de los siguientes (3a') a (3c'):

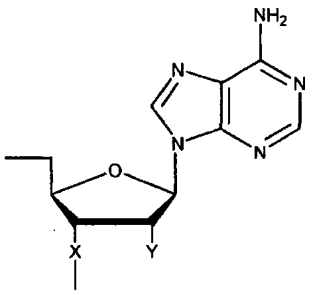
(3a')HO-, (3b')HO-Bc-, o (3c')HO-Bg-Bc-
$B_{M'3}$ es un grupo representado por la siguiente fórmula (3'):

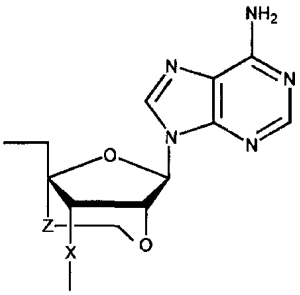
-Bc-Bg-Bc-Bt-Bg-Bc-Bc-Bc-Ba-Ba- (3')

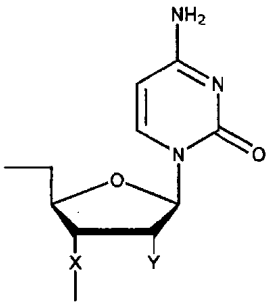
$B_{B'3}$ es un grupo representado por uno cualquiera de los siguientes (32a') a (32i'):
(32a')-CH_2CH_2OH, (32b')-Bt-CH_2CH_2OH,
(32c')-Bt-Bg-CH_2CH_2OH, (32d')-Bt-Bg-Bc-CH_2CH_2OH,
(32e')-Bt-Bg-Bc-Bc-CH_2CH_2OH, (32f')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-CH_2CH_2OH,
(32g')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-Bt-CH_2CH_2OH, (32h')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-Bt-Bc-CH_2CH_2OH, o
(32i')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-Bt-Bc-Bc-CH_2CH_2OH,
donde Bg es un grupo representado por la siguiente fórmula (G1) o (G2); Ba es un grupo representado por la siguiente fórmula (A1) o (A2); Bc es un grupo representado por la siguiente fórmula (C1) o (C2); y Bt es un grupo representado por la siguiente fórmula (U1) o (T2):


(G1)

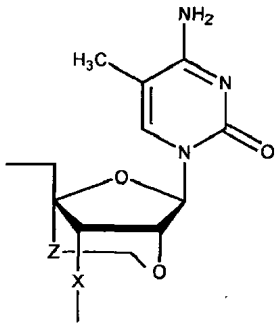

(G2)


(A1)

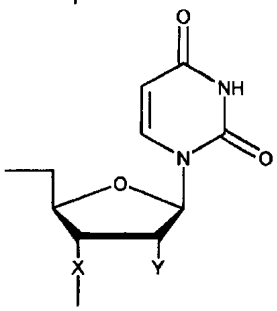

(A2)



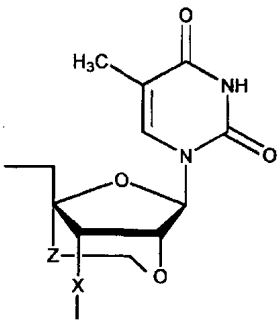
(C1)



(C2)

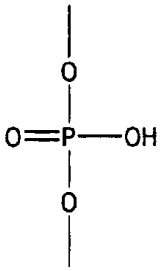


(U1)

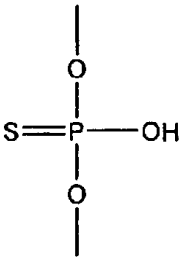


(T2)

donde X es individual e independientemente un grupo representado por la siguiente fórmula (XI) o (X2):



(X1)



(X2)

Y es individual e independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi con 1-6 átomos de carbono; y Z es individual e independientemente un enlace sencillo o un grupo alquileno con 1-5 átomos de carbono; con la condición de que al menos uno de los nucleósidos que constituyen el compuesto representado por la fórmula (III') tenga un grupo 2'-O,4'-C-alquileno.

[2] El compuesto de [1] anterior o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, donde el azúcar que constituye el oligonucleótido es D-ribofuranosa y la modificación del azúcar es 2'-O-alquilación y/o 2'-O,4'-C-alquilenación de la D-ribofuranosa.

[3] El compuesto de [1] o [2] anterior o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, donde la modificación del fosfato es tioación del grupo fosfato.

[4] El compuesto de [1], [2] o [3] anterior o una sal farmacológicamente aceptable del mismo que está representada por una cualquiera de las fórmulas seleccionadas entre el grupo que consiste en (A033), (AO85), (AO88) y (AO86), o una sal farmcéuticamente aceptable de los mismos:

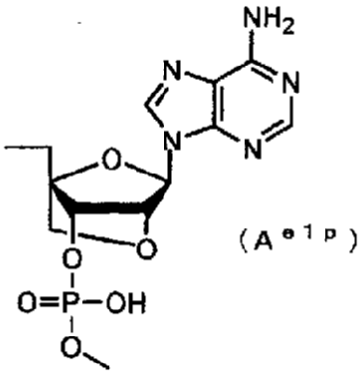
(AO33): HO-G^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-U^{mp}-G^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-A^{e2p}-A^{e2p}-T^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 14)

(AO85): HO-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-U^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 15)

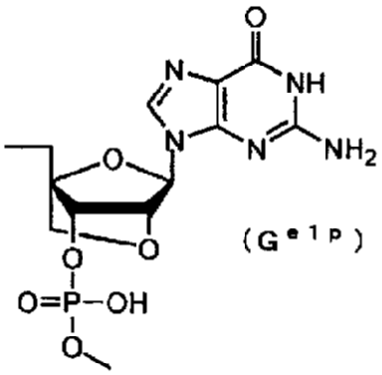
(AO88): HO-C^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-U^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 15)

(AO86): HO-C^{e2p}-A^{mp}-G^{mp}-T^{e2p}-T^{e2p}-U^{mp}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 16)

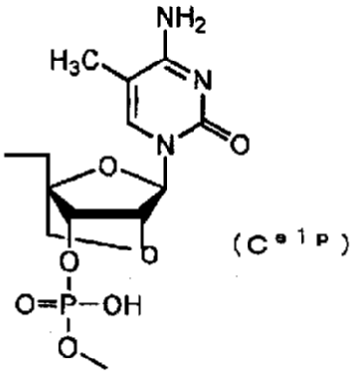
donde A^{e1p}, G^{e1p}, C^{e1p}, T^{e1p}, A^{e2p}, G^{e2p}, C^{e2p}, T^{e2p}, A^{mp}, G^{mp}, C^{mp}, U^{mp}, A^{e1s}, G^{e1s}, C^{e1s}, T^{e1s}, A^{e2s}, G^{e2s}, C^{e2s}, T^{e2s}, A^{ms}, G^{ms}, C^{ms}, y U^{ms} son grupos que tienen las siguientes estructuras, respectivamente:



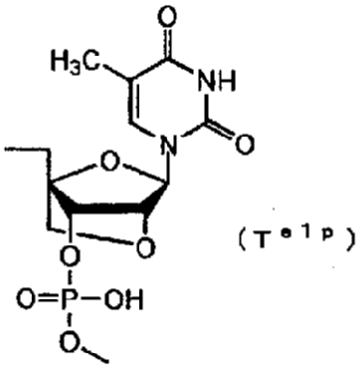
(A e1p)



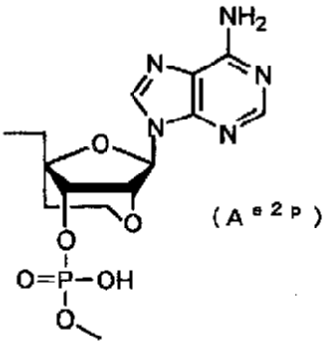
(G e1p)



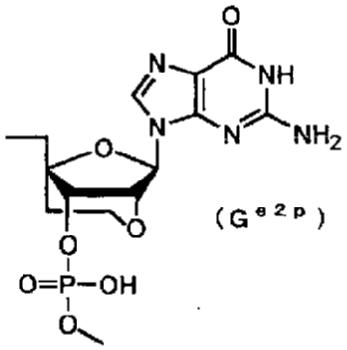
(C e1p)



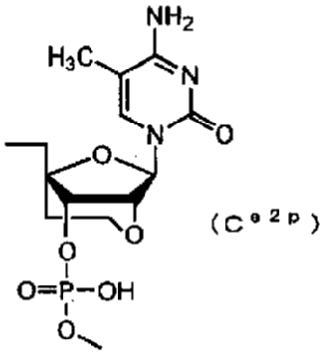
(T e1p)



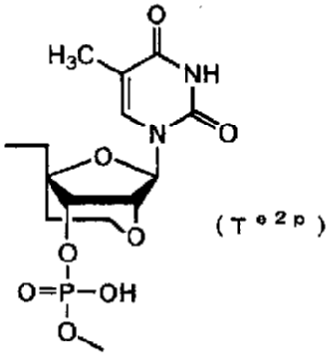
(A e2p)



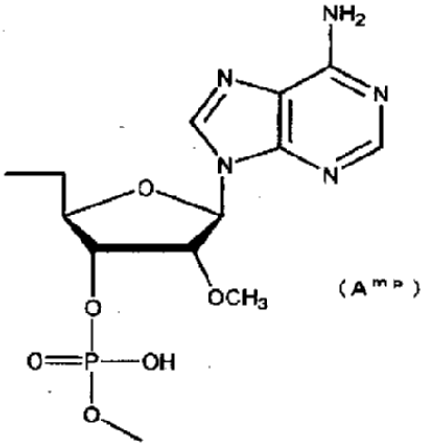
(G e2p)



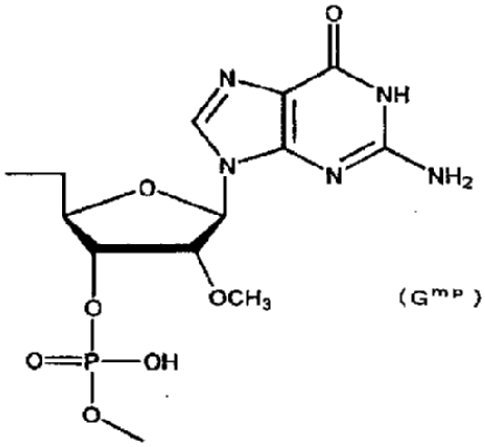
(C e2p)



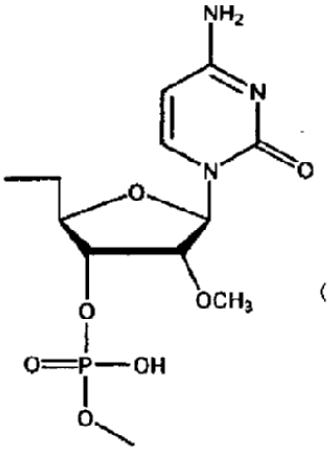
(T e2p)



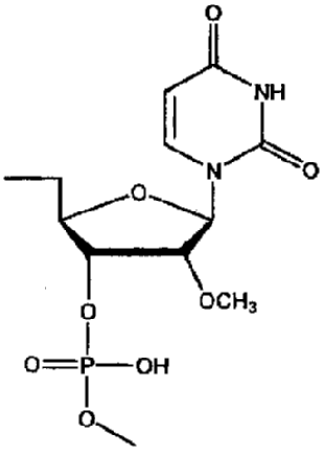
(A^mp)



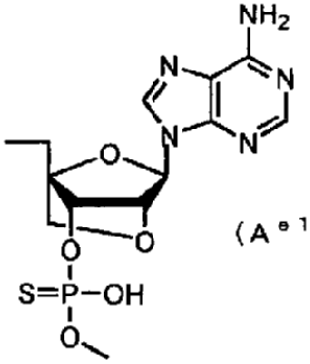
(G^mp)



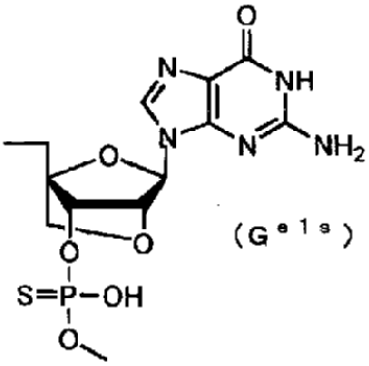
(C^mp)



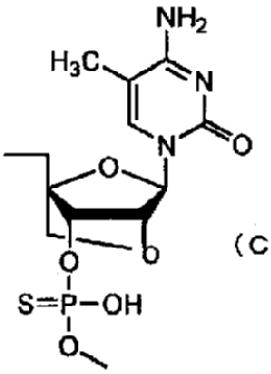
(U^mp)



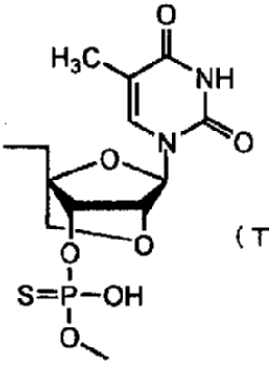
(A^els)



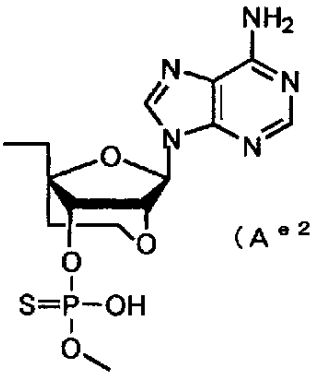
(G^els)



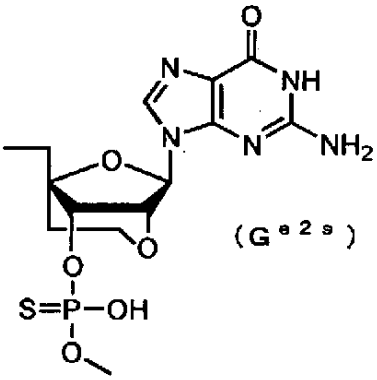
(C^els)



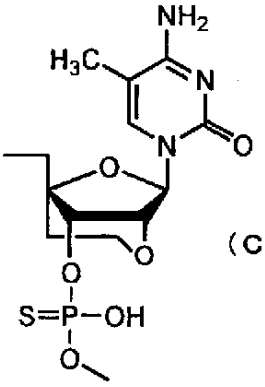
(T^els)



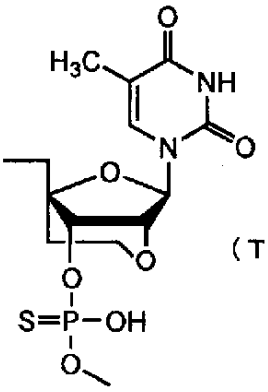
(A^{e2s})



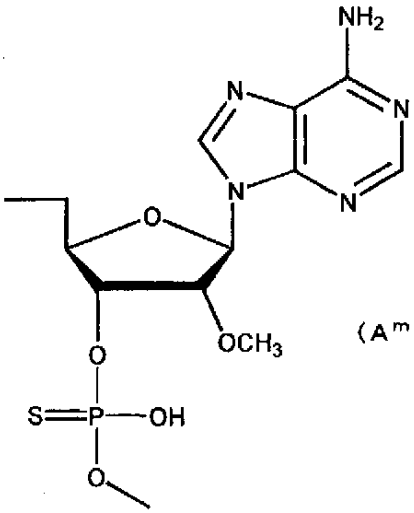
(G^{e2s})



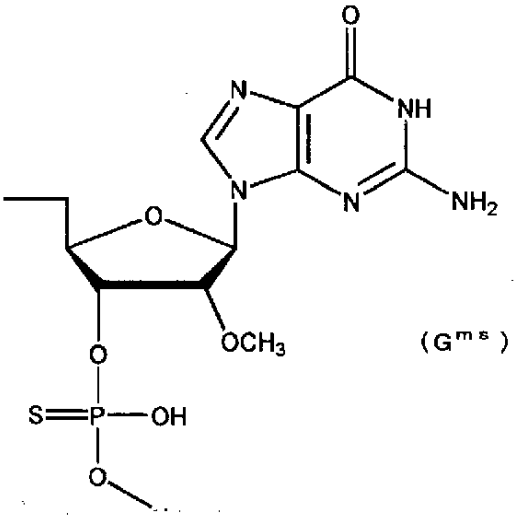
(C^{e2s})



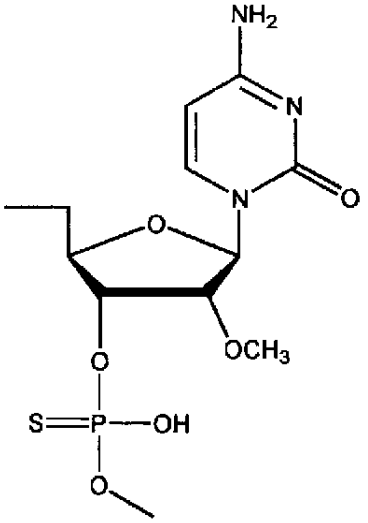
(T^{e2s})



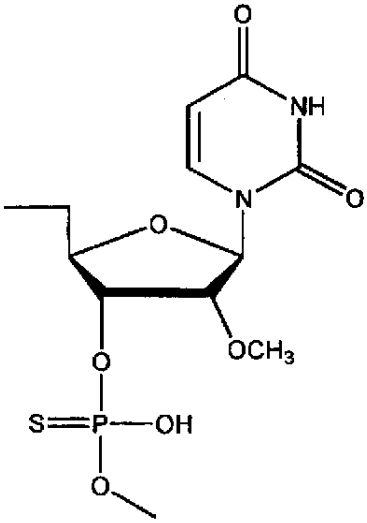
(A^{ms})



(G^{ms})



(C^{ms})



(U^{ms})

[5] Un agente terapéutico para la distrofia muscular, que comprende el compuesto de uno cualquiera de [1] a [4] anterior o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

[6] El agente terapéutico de [5] anterior, cuya diana de tratamiento es aquellos pacientes en que la cantidad total de los aminoácidos en la fase de lectura abierta del gen de la distrofina será un múltiplo de 3 cuando el exón 45 del gen de la distrofina se ha saltado.

[7] Un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4] anterior o un agente terapéutico de acuerdo con [5] o [6] anterior para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular.

[8] Uso de un compuesto de acuerdo con uno cualquiera de [1] o [4] anterior en la fabricación de un medicamento para tratar la distrofia muscular.

[9] Uso de acuerdo con [8] anterior donde la diana de tratamiento es aquellos pacientes en que la cantidad total de los aminoácidos en la fase de lectura abierta del gen de la distrofina será un múltiplo de 3 cuando el exón 45 del gen de la distrofina se ha saltado.

[10] Un agente terapéutico de acuerdo con [5] o [6], un compuesto o agente terapéutico de acuerdo con [7] o un uso de acuerdo con [8] o [9] donde dicha distrofia muscular es distrofia muscular de Duchenne.

El término "oligonucleótido" usado en la presente invención abarca no solamente oligo ADN u oligo ARN, sino también un oligonucleótido en que al menos una D-ribofuranosa que constituye el oligonucleótido está 2'-O-alquilada; un oligonucleótido en que al menos una D-ribofuranosa que constituye el oligonucleótido está 2'-O,4'-C-alquilenada; un oligonucleótido en que al menos un fosfato que constituye el oligonucleótido está tioado; o una combinación de los mismos. Dichos oligonucleótidos en que al menos una D-ribofuranosa que constituye el oligonucleótidos está 2'-O-alquilada o 2'-O,4'-C-alquilenada tiene elevada fuerza de unión a ARN y elevada resistencia a nucleasa. Por tanto, se espera que produzcan mayores efectos terapéuticos que los nucleótidos naturales (es decir oligo ADN u oligo ARN). Además, un oligonucleótido en que al menos un fosfato que constituye el oligonucleótido está tioado también tiene elevada resistencia a nucleasa y, por tanto, se espera que produzca mayor efecto terapéutico que los nucleótidos naturales (es decir oligo ADN u oligo ARN). Un oligonucleótido que comprende tanto el azúcar modificado como el fosfato modificado como se ha descrito anteriormente aún tiene mayor resistencia a nucleasa y, por tanto, se espera que produzca aún mayor efecto terapéutico.

Con respecto al oligonucleótido de la presente invención, ejemplos de la modificación del azúcar incluyen, aunque sin limitación, 2'-O-alquilación (por ejemplo, 2'-O-metilación, 2'-O-aminoetilación, 2'-O-propilación, 2'-O-alilación, 2'-O-metoxietilación, 2'-O-butilación, 2'-O-pentilación, o 2'-O-propargilación) de D-ribofuranosa; 2'-O,4'-C-alquilenación (por ejemplo, 2'-O,4'-C-etilenación, 2'-O,4'-C-metilenación, 2'-O,4'-C-propilenación, 2'-O,4'-C-tetrametilación o 2'-O,4'-C-pentametilación) de D-ribofuranosa; 3'-desoxi-3'-amino-2'-desoxi-D-ribofuranosa; y 3'-desoxi-3'-amino-2'-desoxi-2'-fluoro-D-ribofuranosa.

Con respecto al oligonucleótido de la presente invención, ejemplos de la modificación del fosfato incluyen, aunque sin limitación, fosforotioato, metilfosfonato, metiltiofosfonato, fosforoditioato y fosforoamidato.

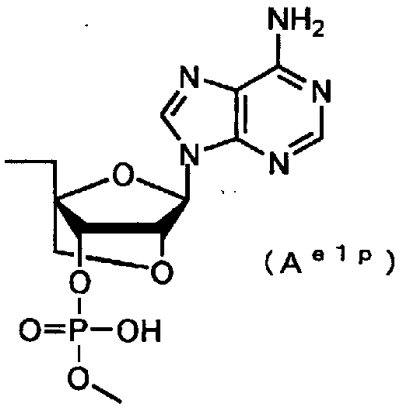
Con respecto a Y en las fórmulas (G1), (A1), (C1) y (U1), ejemplos del grupo alcoxi con 1-6 átomos de carbono incluyen, aunque sin limitación, grupo metoxi, grupo aminoetoxi, grupo propoxi, grupo aliloxi, grupo metoxietoxi, grupo butoxi, grupo pentiloxi, y grupo propargiloxi.

Con respecto a Z en las fórmulas (G2), (A2), (C2) y (T2), ejemplos del grupo alquileno con 1-5 átomos de carbono incluyen, aunque sin limitación, grupo metileno, grupo etileno, grupo propileno, grupo tetrametileno y grupo pentametileno.

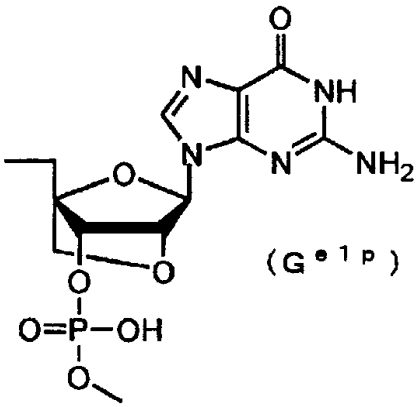
Ejemplos preferibles del compuesto representado por la fórmula general (III') incluyen los siguientes compuestos. (m-1) HO-G^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-U^{mp}-G^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-A^{e2p}-A^{e2p}-T^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH; (m-2) HO-G^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-U^{ms}-G^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-A^{e2p}-A^{e2p}-T^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH; (m-3) HO-G^{e2s}-C^{e2p}s-C^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-U^{ms}-G^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-A^{e2s}-A^{e2s}-T^{e2s}-G^{e2s}-C^{e2s}-CH_2CH_2OH; (m-4) HO-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-U^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH; (m-5) HO-C^{e2p}-G^{ms}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e2p}-G^{ms}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{ms}-U^{ms}-C^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH; (m-6) HO-C^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-U^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-CH_2CH_2OH; (m-7) HO-G^{e1p}-C^{e1p}-C^{e1p}-G^{e1p}-C^{e1p}-U^{e1p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-A^{e1p}-A^{e1p}-T^{e1p}-G^{e1p}-C^{e1p}-CH_2CH_2OH; (m-8) HO-G^{e1p}-C^{e1p}-C^{e1p}-G^{e1p}-C^{e1p}-U^{ms}-G^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-A^{e1p}-A^{e1p}-T^{e1p}-G^{e1p}-C^{e1p}-CH_2CH_2OH; (m-9) HO-G^{e1s}-C^{e1s}-C^{e1s}-G^{e1s}-C^{e1s}-U^{ms}-G^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-C^{ms}-A^{e1s}-A^{e1s}-T^{e1s}-G^{e1s}-C^{e1s}-CH_2CH_2OH; (m-10) HO-C^{e1p}-G^{mp}-C^{e1p}-T^{e1p}-G^{mp}-C^{e1p}-C^{e1p}-C^{e1p}-A^{mp}-A^{mp}-T^{e1p}-G^{mp}-C^{e1p}-C^{e1p}-A^{mp}-U^{mp}-C^{e1p}-C^{e1p}-CH_2CH_2OH; (m-11) HO-C^{e1p}-G^{ms}-C^{e1p}-T^{e1p}-G^{ms}-C^{e1p}-C^{e1p}-C^{e1p}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e1p}-G^{ms}-C^{e1p}-C^{e1p}-A^{ms}-U^{ms}-C^{e1p}-C^{e1p}-CH_2CH_2OH; (m-12) HO-C^{e1s}-G^{ms}-C^{e1s}-T^{e1s}-G^{ms}-C^{e1s}-C^{e1s}-C^{e1s}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e1s}-G^{ms}-C^{e1s}-C^{e1s}-A^{ms}-U^{ms}-C^{e1s}-C^{e1s}-CH_2CH_2OH. Son especialmente preferibles (m-1) a (m-6).

Ejemplos preferibles del compuesto representado por la fórmula general (III") incluyen los siguiente compuestos. (III"-1)HO-G^{mp}-A^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-A^{mp}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{e2p}-A^{mp}-T^{e2p}-U^{mp}-U^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-CH_2CH_2OH; (III"-2) HO-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{mp}-A^{mp}-T^{e2p}-U^{mp}-U^{mp}-C^{e2p}-U^{mp}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-C^{e2p}-A^{e2p}-G^{mp}-CH_2CH_2OH; (III"-3) HO-C^{e2p}-A^{mp}-T^{e2P}-A^{mp}-A^{mp}-T^{e2p}-G^{mP}-A^{mp}-A^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH; (III"-4) HO-G^{mp}-A^{e1p}-A^{mp}-A^{mp}-A^{mp}-C^{e1p}-G^{mp}-C^{e1p}-C^{e1p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{e1p}-A^{mp}-T^{e1p}-U^{mp}-U^{mp}-C^{e1p}-T^{e1p}-CH_2CH_2OH; (III"-5) HO-G^{mp}-C^{e1p}-C^{e1p}-G^{mp}-C^{e1p}-C^{mp}-A^{mp}-T^{e1p}-U^{mp}-U^{mp}-C^{e1p}-U^{mp}-C^{e1p}-A^{mp}-A^{mp}-C^{e1p}-A^{e1p}-G^{mp}-CH2CH_2OH; (III"-6) HO-C^{e1p}-A^{mp}-T^{e1p}-A^{mp}-A^{mp}-T^{e1p}-G^{mp}-A^{mp}-A^{e1p}-A^{mp}-A^{mp}-C^{e1p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{e1p}-G^{mp}-C^{e1p}-C^{e1p}-CH_2CH_2OH; (III"-7) HO-G^{ms}-A^{e2p}-A^{ms}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e2p}-G^{ms}-C^{e2p}-G^{e2p}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2p}-A^{ms}-T^{e2p}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e2p}-T^{e2p}-CH_2CH_2OH; (III"-8) HO-G^{ms}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{ms}-C^{e2p}-C^{ms}-A^{ms}-T^{e2p}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e2p}-U^{ms}-C^{e2p}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e2p}-A^{e2p}-G^{ms}-CH_2CH_2OH; (III"-9) HO-C^{e2p}-A^{ms}-T^{e2p}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e2p}-G^{ms}-A^{ms}-A^{e2p}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e2p}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2p}-G^{ms}-C^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH; (III"-10) HO-G^{ms}-A^{e1p}-A^{ms}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e1p}-G^{ms}-C^{e1p}-C^{e1p}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e1p}-A^{ms}-T^{e1p}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e1p}-T^{e1p}-CH_2CH_2OH; (III"-11) HO-G^{ms}-C^{e1p}-C^{e1p}-G^{ms}-C^{e1p}-C^{ms}-A^{ms}-T^{e1p}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e1p}-U^{ms}-C^{e1p}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e1p}-A^{e1p}-G^{ms}-CH_2 CH_2OH; (III"-12) HO-C^{e1p}-A^{ms}-T^{e1p}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e1p}-G^{ms}-A^{ms}-A^{e1p}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e1p}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e1p}-G^{ms}-C^{e1p}-C^{e1p}-CH_2CH_2OH; (III"-13) HO-G^{ms}-A^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2s}-A^{ms}-T^{e2s}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e2s}-T^{e2s}-CH_2CH_2OH; (III"-14) HO-G^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-C^{ms}-A^{ms}-T^{e2s}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e2s}-U^{ms}-C^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e2s}-A^{e2s}-G^{ms}-CH_2CH_2OH; (III"-15) HO-C^{e2s}-A^{ms}-T^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e2s}-G^{ms}-A^{ms}-A^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e2s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-CH_2CH_2OH; (III"-16) HO-G^{ms}-A^{e1s}-A^{ms}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e1s}-G^{ms}-C^{e1s}-C^{e1s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e1s}-A^{ms}-T^{e1s}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e1s}-T^{e1s}-CH_2CH_2OH; (III"-17) HO-G^{ms}-C^{e1s}-C^{e1s}-G^{ms}-C^{e1s}-C^{ms}-A^{ms}-T^{e1s}-U^{ms}-U^{ms}-C^{e1s}-U^{ms}-C^{e1s}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e1s}-A^{e1s}-G^{ms}-CH_2CH_2OH; (III"-18) HO-C^{e1s}-A^{ms}-T^{e1s}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e1s}-G^{ms}-A^{ms}-A^{e1s}-A^{ms}-A^{ms}-C^{e1s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e1s}-G^{ms}-C^{e1s}-C^{e1s}-CH_2CH_2OH. Son especialmente preferibles (III"-2), (III"-3), (III"-13), (III"-14) y (III"-15).

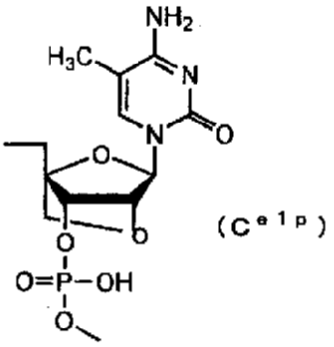
En la presente memoria descriptiva, A^{e1p}, G^{e1p}, C^{e1p}, T^{e1p}, A^{e2p}, G^{e2p}, C^{e2p}, T^{e2p}, A^{mp}, G^{mp}, C^{mp}, U^{mp}, A^{e1s}, G^{e1s}, C^{e1s}, T^{e1s}, A^{e2s}, G^{e2s}, C^{e2s}, T^{e2s}, A^{ms}, G^{ms}, C^{ms}, U^{ms} y Ph son grupos que tienen las siguientes estructuras, respectivamente.



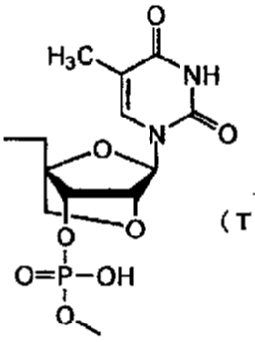
(A^{e1p})



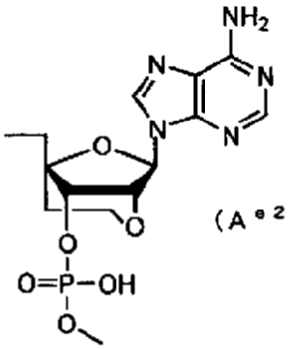
(G^{e1p})



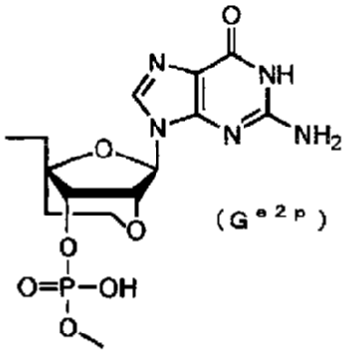
(C e1p)



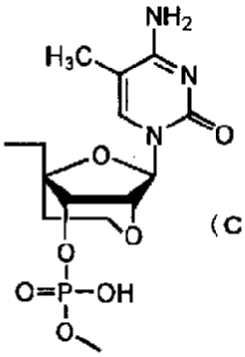
(T e1p)



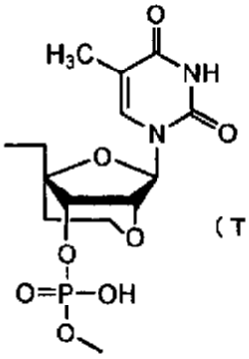
(A e2p)



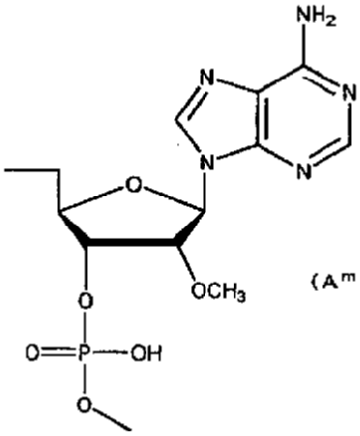
(G e2p)



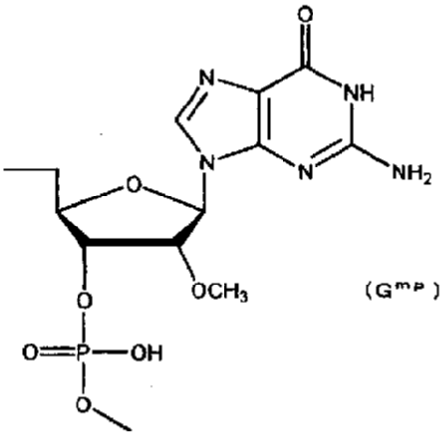
(C e2p)



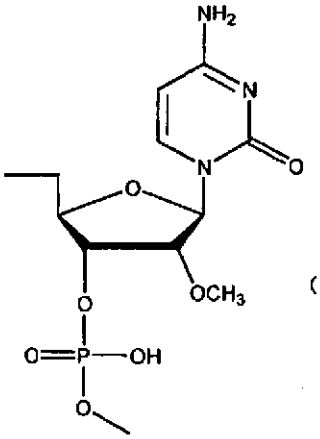
(T e2p)



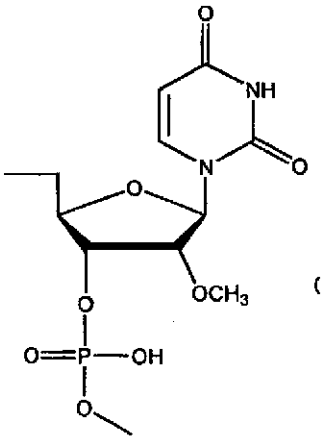
(A mp)



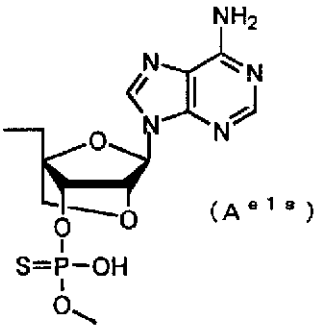
(G mp)



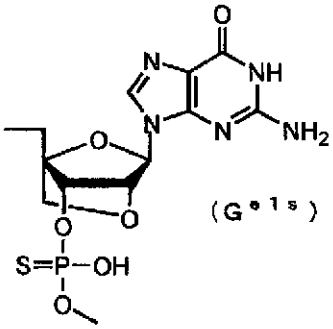
(C^mp)



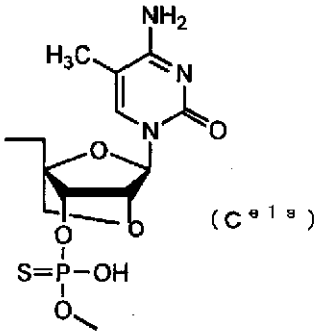
(U^mp)



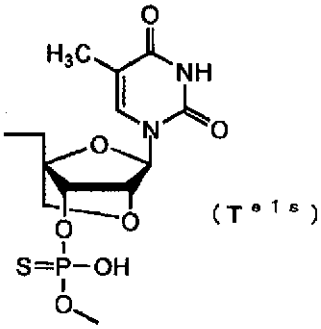
(A^e1s)



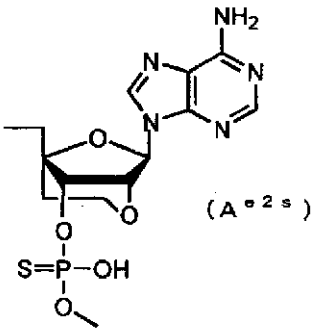
(G^e1s)



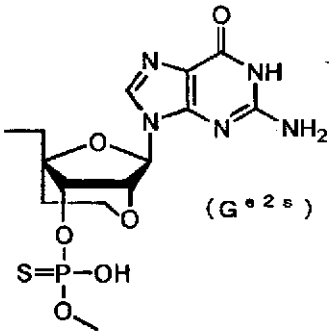
(C^e1s)



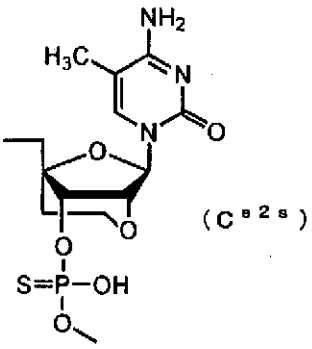
(T^e1s)



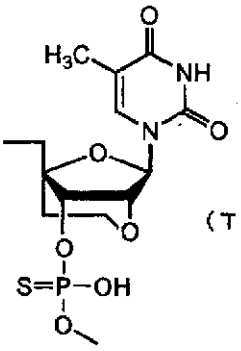
(A^e2s)



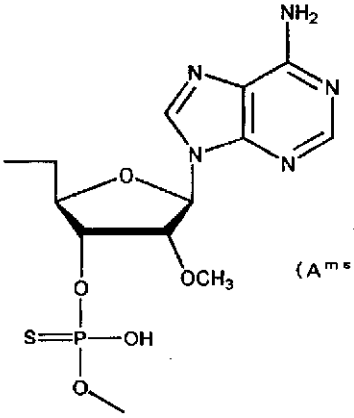
(G^e2s)



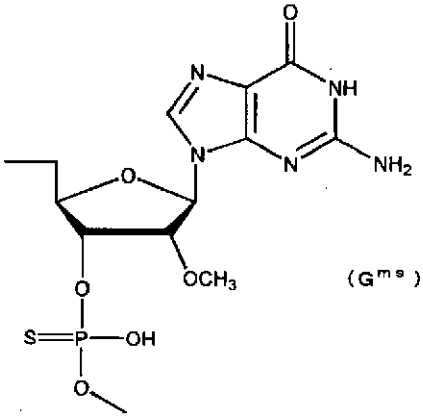
(C^{s2s})



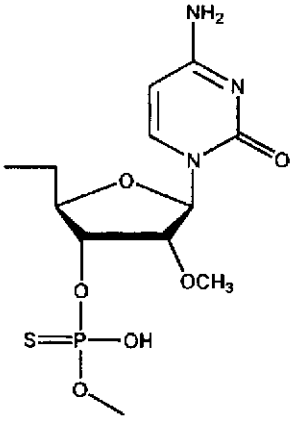
(T^{s2s})



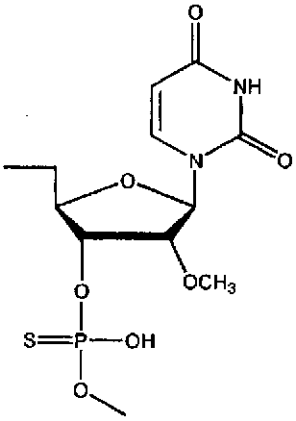
(A^{ms})



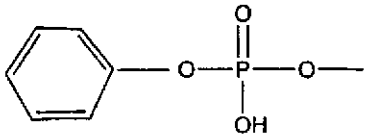
(G^{ms})



(C^{ms})



(U^{ms})



(Ph)

La expresión "sal farmacológicamente aceptable del mismo" usada en la presente memoria descriptiva se refiere a sales del oligonucleótido de la invención (por ejemplo, oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de las SEC ID Nº 15, 14 y 16) o sales de aquellos compuestos representados por la fórmula general (III'). Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de metales tales como sales de metales alcalinos (por ejemplo, sales de sodio, sales de potasio, sales de litio), sales de metales alcalino-térreos (por ejemplo, sales de calcio, sales de magnesio), sales de aluminio, sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de níquel, sales de cobalto y similares; sales amina tales como sales inorgánicas (por ejemplo, sales de amonio), sales orgánicas [por ejemplo sales de t-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de fenilglicina alquil éster, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de diciclohexilamina; sales de N',N'-dibenciletilendiamina, sales de

cloroprocaína, sales de procaína, sales de dietanolamina, sales de N-bencil-fenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio, sales de tris(hidroximetil)aminometano] y similares; sales de ácidos inorgánicos tales como sales de hidroácidos halogenados (por ejemplo, fluorhidratos, clorhidratos, bromhidratos, yodhidratos), nitratos, percloratos, sulfatos, fosfatos y similares; sales de ácidos orgánicos tales como sulfonatos de alcano inferior (por ejemplo, metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos, etanosulfonatos), aril sulfonatos (por ejemplo, bencenosulfonatos, p-toluenosulfonatos), acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartratos, oxalatos, maleatos y similares; y sales de aminoácidos (por ejemplo, sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, glutamatos, aspartatos). Estas sales pueden prepararse de acuerdo con métodos conocidos.

Debe apreciarse que los compuestos representados por la fórmula general (III') puede existir como hidratos y que dichos hidratos también se incluyen en la presente invención.

El oligonucleótido de la invención, los compuestos representados por la fórmula general (III') (a partir de ahora en este documento, mencionados como el "compuesto de la invención") y sales farmacológicamente aceptables de los mismos son eficaces como agentes farmacéuticos para tratar la distrofia muscular.

El compuesto de la invención puede sintetizarse en base al método descrito en la bibliografía (Nucleic Acids Research, 12: 4539 (1984)) usando un sintetizar comercial (por ejemplo, PerkinElmer Modelo 392 que emplea el método de fosforoamidita). En cuanto a los reactivos de fosforoamidita usados en la síntesis, están disponibles reactivos comerciales para nucleósidos naturales y 2'-O-metilnucleósidos (es decir 2'-O-metilguanosina, 2'-O-metiladenosina, 2'-O-metilcitosina y 2'-O-metiluridina). En cuanto a 2'-O-alquil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina donde el grupo alquilo tiene 2-6 átomos de carbono, pueden sintetizarse o adquirirse como se describe a continuación.

2'-O-aminoetil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina pueden sintetizarse de acuerdo con Blommers et al., Biochemistry (1998), 37: 17714-17725.

2'-O-propil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina pueden sintetizarse de acuerdo con Lesnik, E.A. et al., Biochemistry (1993), 32: 7832-7838.

2'-O-alil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina están disponibles en el mercado. 2'-O-metoxietil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina pueden sintetizarse de acuerdo con la patente de Estados Unidos Nº 6261840 o Martin, P., Helv. Chim. Acta. (1995) 78: 486-504.

2'-O-butil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina pueden sintetizarse de acuerdo con Lesnik, E.A. et al., Biochemistry (1993), 32: 7832-7838.

2'-O-pentil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina pueden sintetizarse de acuerdo con Lesnik, E.A. et al., Biochemistry (1993), 32: 7832-7838.

2'-O-propargil-guanosina, -adenosina, -citosina y -uridina están disponibles en el mercado.

2'-O,4'-C-metileno-guanosina, -adenosina, 5-metil-citosina y -timidina pueden sintetizarse de acuerdo con el método descrito en el documento WO99/14226. 2'-O,4'-C-alquileno-guanosina y -adenosina donde el grupo alquileno tiene 2-5 átomos de carbono, 5-metil-citosina y -timidina pueden sintetizarse de acuerdo con el método descrito en el documento WO00/47599.

En la tioación de grupos fosfato, los derivados tioato pueden obtenerse en base a los métodos descritos en Tetrahedron Letters, 32, 3005 (1991) y J. Am. Chem. Soc., 112, 1253 (1990), usando azufre y un reactivo tal como disulfuro de tetraetiltiuram (TETD; Applied Biosystems) o reactivo de Beaucage (Glen Research) que reacciona con un fosfato trivalente para formar un tioato.

Con respecto al vidrio de poro controlado (DPG) usado en el sintetizador, el uso de un CPG modificado (descrito en el Ejemplo 12b de la publicación de patente japonesa no examinada Nº H7-87982) permite la síntesis de oligonucleótidos a los cuales se ha unido un grupo 2-hidroxietilfosfato en el extremo 3'. Además, el uso del modificador 3'-amino C3 CPG, modificador 3'-amino C7 CPG, Gliceril CPG (Glen Research), 3'-specer C3 SynBase CPG 1000 o 3'-specer C9 SynBase CPG 1000 (Link Technologies) permite la síntesis de oligonucleótidos a los cuales se ha unido un grupo hidroxialquilfosfato o grupo aminoalquilfosfato al extremo 3'.

Los compuestos de la presente invención y sales farmacológicamente aceptables de los mismos tienen un efecto de inducir el salto del exón 45 del gen de la distrofina. Los compuestos de la invención representados por la fórmula general (III') y sales farmacológicamente aceptables de los mismos tienen elevada fuerza de unión a ARN y elevada resistencia a nucleasa. Por lo tanto, los compuestos de la invención y sales farmacológicamente aceptables de los mismos son útiles como agentes farmacéuticos para tratar la distrofia muscular.

Cuando el compuesto de la invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se usa como agente terapéutico para la distrofia muscular, el compuesto o una sal farmacológicamente aceptable o éster del mismo puede administrarse por sí mismo. Como alternativa, el compuesto o una sal farmacológicamente aceptable o éster del mismo puede mezclarse con excipientes o diluyentes farmacológicamente aceptables apropiados, preparados en comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos, jarabes, etc. y administrarse por vía oral; o prepararse en inyecciones, supositorios, parches, medicinas externas, etc. y administrarse por vía parenteral.

Estas formulaciones pueden prepararse por métodos bien conocidos usando aditivos tales como excipientes [excipientes orgánicos por ejemplo derivados de azúcar (tales como lactosa, azúcar blanco, glucosa, manitol y sorbitol), derivados de almidón (tal como almidón de maíz, almidón de patata, almidón α y dextrina), derivados de celulosa (tales como celulosa cristalina), goma arábiga, dextrano, pululano y similares; y excipientes inorgánicos por ejemplo derivados de silicato (tales como anhídrido de ácido silícico ligero, silicato de aluminio sintético, silicato de calcio y aluminato metasilicato de magnesio), fosfatos (tales como hidrogenofosfato de calcio), carbonatos (tales como carbonato de calcio), sulfatos (tales como sulfato de calcio) y similares], lubricantes (por ejemplo, sales metálicas de ácido esteárico tal como ácido esteárico, estearato de calcio, y estearato de magnesio; talco; sílice coloidal; ceras tales como cera de abejas y espermaceti; ácido bórico; ácido adípico; sulfatos tales como sulfato sódico; glicol; ácido fumárico; benzoato sódico; DL leucina; lauril sulfatos tales como lauril sulfato sódico y lauril sulfato de magnesio; materiales de ácido silícico tales como anhídrido de ácido silícico y ácido silícico hidrato; derivados de almidón mencionados anteriormente), aglutinantes (por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, macrogol, compuestos enumerados anteriormente como excipientes), disgregantes (por ejemplo, derivados de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, carboximetil-celulosa, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa sódica reticulada de forma interna; almidones/celulosas modificadas químicamente tales como carboximetil almidón, carboximetil almidón sódico, polivinilpirrolidona reticulada), emulsionantes (por ejemplo, arcilla coloidal tal como bentonita, Veegum; hidróxidos metálicos tales como hidróxido de magnesio, hidróxido de aluminio; tensioactivos aniónicos tales como lauril sulfato sódico, estearato de calcio; tensioactivos catiónicos tales como cloruro de benzalconio; tensioactivos no iónicos tales como polioxietilen alquil éteres, ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitán, éster de ácido graso de sacarosa), estabilizantes (por ejemplo, ésteres de ácido paraoxibenzoico tales como metil parabeno, propil parabeno; alcoholes tales como clorobutanol, alcohol bencílico, feniletil alcohol; cloruro de benzalconio; fenoles tales como fenol, cresol; timerosal; ácido deshidroacético; ácido sórbico), agentes aromatizantes/aromáticos (por ejemplo, edulcorantes usados de forma convencional, acidificantes, aromáticos, etc.) o diluyentes.

El agente terapéutico de la presente invención comprende preferiblemente 0,05-5 μmoles/ml del compuesto de la invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, el 0,02-10% p/v de carbohidratos o alcoholes polihídricos, y el 0,01-0,4% p/v de tensioactivos farmacológicamente aceptables. Un intervalo más preferible para el contenido del compuesto de la invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo es 0,1-1 μmoles/ml.

Para los carbohidratos anteriores, los monosacáridos y/o disacáridos son especialmente preferibles. Ejemplos de estos carbohidratos y alcoholes polihídricos incluyen, aunque sin limitación, glucosa, galactosa, manosa, lactosa, maltosa, manitol y sorbitol. Éstos pueden usarse solos o en combinación.

Ejemplos preferibles de tensioactivos incluyen, aunque sin limitación, mono- a tri-ésteres de polioxietilen sorbitán, alquil fenil polioxietileno, taurocolato sódico, colato sódico y ésteres de alcoholes polihídricos. Son especialmente preferibles mono- a tri-ésteres de polioxietilen sorbitán, donde son ésteres especialmente preferibles oleatos, lauratos, estearatos y palmitatos. Estos tensioactivos pueden usarse solos o en combinación.

Más preferiblemente, el agente terapéutico de la invención comprende 0,03-0,09 M de sal neutra farmacológicamente aceptable, por ejemplo cloruro sódico, cloruro de potasio y/o cloruro de calcio.

Aún más preferiblemente, el agente terapéutico de la invención puede comprender 0,002-0,05 M de tampón farmacológicamente aceptable. Ejemplos de tampones preferibles incluyen citrato sódico, glicinato sódico, fosfato sódico y tris(hidroximetil)aminometano. Estos tampones pueden usarse solos o en combinación.

El agente terapéutico descrito anteriormente de la invención puede suministrarse en estado de solución. Sin embargo, considerando el almacenamiento del agente terapéutico durante algún periodo de tiempo, habitualmente, es preferible liofilizar el agente terapéutico con el fin de estabilizar el oligonucleótido antisentido y evitar de este modo la disminución de su efecto terapéutico. El agente terapéutico liofilizado puede reconstruirse con un líquido disolvente (por ejemplo, agua destilada para inyección) en el momento de uso, y usarse en estado de solución. Por tanto, el agente terapéutico de la invención abarca dicho agente terapéutico liofilizado a reconstruirse con un líquido disolvente en el momento de uso de modo que los componentes individuales estén bajo intervalos de concentración específicos. Para potenciar la solubilidad del producto liofilizado, el agente terapéutico puede contener adicionalmente albúmina o aminoácidos tales como glicina.

Cuando el compuesto de la invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo se administra a seres humanos, por ejemplo, el compuesto o sal puede administrarse por vía oral o intravenosa a una dosis de aproximadamente 0,1-100 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente 1-50 mg/kg de peso corporal por día

para pacientes adultos una vez al día o dividido en varias porciones. La dosis y la cantidad de veces de administración pueden cambiarse apropiadamente dependiendo del tipo de enfermedad, condiciones, la edad del paciente, la vía de administración, etc.

La administración del compuesto de la invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo a pacientes con DMD puede realizarse, por ejemplo, como se describe a continuación. En resumen, el compuesto de la invención o una sal farmacológicamente aceptable del mismo puede prepararse por métodos bien conocidos para los especialistas en la técnica, esterilizarse por métodos convencionales y después formularse en, por ejemplo, una solución de inyección con una concentración de 1200 μg/ml. Esta solución se suministra por goteo, por ejemplo, al paciente de forma intravenosa en forma de infusión de modo que el oligonucleótido antisentido se administra al paciente a una dosis de, por ejemplo, 20 mg/kg de peso corporal. Dicha administración puede repetirse, por ejemplo, 4 veces a intervalos de 2 semanas. Entonces, mientras se confirma el efecto terapéutico usando indicadores tales como la expresión de la proteína distrofina en tejidos de biopsia muscular, los niveles en suero de creatina quinasa y los síntomas clínicos, este tratamiento se repite apropiadamente. Si se reconoce el efecto terapéutico y aún no se observan efectos secundarios definidos, se continúa este tratamiento; en principio, la administración se continúa toda la vida.

La presente memoria descriptiva incluye los contenidos descritos en las memorias descriptivas y/o dibujos de las solicitudes de patente japonesa Nº 2002-340857 y Nº 2003-204381 basadas sobre lo cual la presente solicitud reivindica prioridad.

Breve descripción de los dibujos

La Fig.1 muestra los efectos de los compuestos de los Ejemplos 2-5 (AO33, A085, AO86 y AO87) sobre el salto del exón 45.

Mejores modos de realizar la invención

A partir de ahora en este documento, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los siguientes Ejemplos. Estos Ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar la presente invención.

(EJEMPLO 1) - No de la invención

Síntesis de HO-A^{e2p}-G^{e2p}-T^{e2p}-T^{e2p}-G^{e2p}-A^{mp}-G^{mp}-U^{mp}-C^{mp}-U^{mp}-U^{mp}-C^{mp}-G^{mp}-A^{mp}-A^{mp}-A^{mp}-C^{mp}-U^{mp}-G^{e2p}-N^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-A^{e2p}-C H_2CH_2OH (AO20) (SEC ID Nº 10)

El presente compuesto se sintetizó con un sintetizador automático de ácidos nucleicos (sintetizador de ADN/ARN PerkinElmer ABI modelo 394) usando un programa de ADN de 40 nmol. Las concentraciones de disolventes, reactivos y fosforoamiditas en ciclos individuales de síntesis fueron las mismas que las usadas en la síntesis de oligonucleótidos naturales. Los disolventes, reactivos y fosforoamiditas de 2'-O-metilnucleósido (forma adenosina: producto Nº 27-1822-41; forma guanosina: producto Nº 27-1826-41; forma citidina: producto Nº 27-1823-02; forma uridina: producto Nº 27-1825-42) fueron productos de Amersham Pharmacia. Como fosforoamiditas no naturales, se usaron aquellos compuestos descritos en el Ejemplo 28 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etileno-6-N-benzoiladenosina-3'-O-(2-ciano etil N,N-diisopropil)fosforoamidita), Ejemplo 41 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etileno-N-isobutililguanosina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita), Ejemplo 36 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etileno-4-N-benzoil-5-metilcitidina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita), y Ejemplo 23 (5'-O-dimetoxitritil-2'-O,4'-C-etileno-5-metiluridina-3'-O-(2-cianoetil N,N-diisopropil)fosforoamidita) de la publicación de patente japonesa no examinada Nº 2000-297097. El presente compuesto se sintetizó usando aproximadamente 0,25 μmol de un vidrio de poro controlado modificado (CPG) (descrito en el Ejemplo 12b de la publicación de patente japonesa no examinada Nº H7-87982) como soporte sólido. Sin embargo, el periodo de tiempo para la condensación de amiditas fue de 15 min.

El análogo oligonucleotídico protegido que tiene la secuencia de interés se trató con amoniaco acuoso concentrado para cortar de este modo el oligómero del soporte y, al mismo tiempo, retirar los grupos cianoetilo protectores en átomos de fósforo y los grupos protectores en bases de ácido nucleico. El disolvente se retiró por destilación a presión reducida, y el residuo resultante se purificó por HPLC de fase inversa [Shimadzu modelo LC-10VP; columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo B%: 10% → 55% (10 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm]. Se recogió la fracción eluida a 6,29 min. Después de retirar por destilación el disolvente a presión reducida, se añadió solución acuosa de ácido acético al 80% al residuo, que después se dejó durante 20 min para retirar el grupo DMTr. Después de retirar por destilación el disolvente, el residuo resultante se disolvió en 0,5 ml de agua y se filtró con Ultrafree-MC (Millipore: producto Nº UFC4 OHV 25). El disolvente se retiró por destilación para obtener de este modo el compuesto de interés (0,473 unidades A_{260}) (λmas (H_2O) = 259 nm). Cuando se analizó por HPLC de fase inversa [columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo al 25%, TEAA 0,1 M B%: 10% → 65%

(10 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm], el presente compuesto se eluyó a 7,62 min. El compuesto se identificó por análisis espectrométrico de masas ESI de iones negativos (valor calculado: 7980,34).

La secuencia de nucleótidos del presente compuesto es complementaria a los nucleótidos Nº. 6133-6155 del ADNc de la distrofina (Nº de acceso a Gene Bank NM_004006.1).

(EJEMPLO 2)

Síntesis de HO-G^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-U^{mp}-G^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-A^{e2p}-A^{e2p}-T^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-H_2CH_2OH (AO33) (SEC ID Nº 14)

El compuesto del Ejemplo 2 que tiene una secuencia de interés se sintetizó del mismo modo en que se sintetizó el compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó por HPLC de fase inversa [Shimadzu modelo LC-10VP; columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo B%: 10% → 45% (10 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm]. Se recogió la fracción eluida a 7,36 min. Después de retirar el disolvente por destilación a presión reducida, se añadió solución acuosa de ácido acético al 80% al residuo, que después se dejó durante 20 min para retirar el grupo DMTr. Después de retirar por destilación el disolvente, el residuo resultante se disolvió en 0,5 ml de agua y se filtró con Ultrafree-MC (Millipore: producto Nº UFC4 OHV 25). El disolvente se retiró por destilación para obtener de este modo el compuesto de interés (12,70 unidades A_{260}) (λmax (H_2O) = 261 nm). Cuando se analizó por HPLC de fase inversa [columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo al 25%, TEAA 0,1 M B%: 15% → 60% (10 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm], el presente compuesto se eluyó a 7,92 min. El compuesto se identificó por análisis espectrométrico de masas ESI de iones negativos (valor calculado: 5250,59; valor medido: 5250,61).

La secuencia de nucleótidos del presente compuesto es complementaria a los nucleótidos Nº 6696-6710 del ADNc de la distrofina (Nº de acceso a Gene Bank NM_004006.1).

(EJEMPLO 3)

Síntesis de HO-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-U^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-H_2CH_2OH (AO85) (SEC ID Nº 15)

El compuesto del Ejemplo 3 que tiene una secuencia de interés se sintetizó del mismo modo que se sintetizó el compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó por HPLC de fase inversa [Shimadzu modelo LC-10VP; columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo B%: 10% → 46% (8 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm]. Se recogió la fracción eluida a 5,32 min. Después de retirar el disolvente por destilación a presión reducida, se añadió solución acuosa de ácido acético al 80% al residuo, que después se dejó durante 20 min para retirar el grupo DMTr. Después de retirar por destilación el disolvente, el residuo resultante se disolvió en 0,5 ml de agua y se filtró con Ultrafree-MC (Millipore: producto Nº UFC4 OHV 25). El disolvente se retiró por destilación para obtener de este modo el compuesto de interés (7,93 unidades A_{260}) (λmax (H_2O) = 261 nm). Cuando se analizó por HPLC de fase inversa [columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo al 25%, TEAA 0,1 M B%: 20% → 80% (10 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm], el presente compuesto se eluyó a 5,63 min. El compuesto se identificó por análisis espectrométrico de masas ESI de iones negativos (valor calculado: 6263,34; valor medido: 6263,40).

La secuencia de nucleótidos del presente compuesto es complementaria a los nucleótidos Nº 6691-6708 del ADNc de la distrofina (Nº de acceso a Gene Bank NM_004006.1).

(EJEMPLO 4)

Síntesis de HO-C^{e2p}-A^{mp}-G^{mp}-T^{e2p}-T^{e2p}-U^{mp}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-CH_2CH_2OH (AO86) (SEC ID Nº 16)

El compuesto del Ejemplo 4 que tiene una secuencia de interés se sintetizó del mismo modo que se sintetizó el compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó por HPLC de fase inversa [Shimadzu modelo LC-10VP; columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo B%: 10% → 46% (8 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm]. Se recogió la fracción eluida a 7,10 min. Después de retirar el disolvente por destilación a presión reducida, se añadió solución acuosa de ácido acético al 80% al residuo, que después se dejó durante 20 min para retirar el grupo DMTr. Después de retirar por destilación el disolvente, el residuo resultante se disolvió en 0,5 ml de agua y se filtró con Ultrafree-MC (Millipore: producto Nº UFC4 OHV 25).

El disolvente se retiró por destilación para obtener de este modo el compuesto de interés (9,01 unidades A_{260}) (λmax (H_2O) = 260 nm). Cuando se analizó por HPLC de fase inversa [columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo al 25%, TEAA 0,1 M B%: 20% → 80% (8 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm], el presente compuesto se eluyó a 6,27 min. El compuesto se identificó por análisis espectrométrico de masas ESI de iones negativos (valor calculado: 6304,35; valor medido: 6304,47).

La secuencia de nucleótidos del presente compuesto es complementaria a los nucleótidos Nº 6699-6716 del ADNc de la distrofina (Nº de acceso a Gene Bank NM_004006.1).

(EJEMPLO 5)

Síntesis de HO-T^{e2p}-G^{mp}-T^{e2p}-T^{e2p}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-A^{mp}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-C^{e2p}-A^{mp}-G^{mp}-T^{e2p}-T^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-CH_2CH_2OH (AO87) (SEC ID Nº 17)

El compuesto del Ejemplo 5 que tiene una secuencia de interés se sintetizó del mismo modo que se sintetizó el compuesto del Ejemplo 1. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó por HPLC de fase inversa [Shimadzu modelo LC-10VP; columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo B%: 10% → 46% (8 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm]. Se recogió la fracción eluida a 5,63 min. Después de retirar el disolvente por destilación a presión reducida, se añadió solución acuosa de ácido acético al 80% al residuo, que después se dejó durante 20 min para retirar el grupo DMTr. Después de retirar por destilación el disolvente, el residuo resultante se disolvió en 0,5 ml de agua y se filtró con Ultrafree-MC (Millipore: producto Nº UFC4 OHV 25). El disolvente se retiró por destilación para obtener de este modo el compuesto de interés (8,65 unidades A_{260}) (λmax (H_2O) = 259 nm). Cuando se analizó por HPLC de fase inversa [columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo al 25%, TEAA 0,1 M B%: 20% → 80% (10 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm], el presente compuesto se eluyó a 6,06 min. El compuesto se identificó por análisis espectrométrico de masas ESI de iones negativos (valor calculado: 6331,33; valor medido: 6331,14).

La secuencia de nucleótidos del presente compuesto es complementaria a los nucleótidos Nº 6710-6727 del ADNc de la distrofina (Nº de acceso a Gene Bank NM_004006.1).

(EJEMPLO 6)

Síntesis de HO-C^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-U^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-CH_2CH_2OH (AO88) (SEC ID Nº 15)

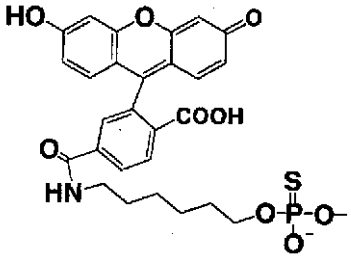
El compuesto del Ejemplo 6 que tiene una secuencia de interés se sintetizó del mismo modo que se sintetizó el compuesto del Ejemplo 1. Sin embargo, la parte con un enlace fosforotioato se sulfuró tratando con una solución mixta de hidruro de xantano 0,02 M/acetonitrilo-piridina (mezcla 9:1) durante 15 min, en lugar de la etapa de oxidación con yodo-H_2O. Después de la desprotección, el producto resultante se purificó por HPLC de fase inversa [Shimadzu modelo LC-10VP; columna: Merck, Chromolith Performance RP-18e (4,6 x 100 mm); solución A: acetonitrilo al 5%, acetato de trietilamina acuoso 0,1 M (TEAA), pH 7,0; solución B: acetonitrilo B%: 10% → 46% (8 min, gradiente lineal); 60ºC; 2 ml/min; 254 nm]. Se recogió la fracción eluida a 6,57 min. Después de retirar el disolvente por destilación a presión reducida, se añadió solución acuosa de ácido acético al 80% al residuo, que después se dejó durante 20 min para retirar el grupo DMTr. Después de retirar por destilación el disolvente, el residuo resultante se disolvió en 0,5 ml de agua y se filtró con Ultrafree-MC (Millipore: producto Nº UFC4 OHV 25). El disolvente se retiró por destilación para obtener de este modo el compuesto de interés (12,02 unidades A_{260}) (λmax (H_2O) = 262 nm). Cuando se analizó por intercambio iónico [columna: Tosoh TSK-gel DEAE-5PW (7,5 x 75 mm); solución A: acetonitrilo al 20%; solución B: acetonitrilo al 20%, tampón fosfato 67 mM (pH 6,8), KBr 1,5 M; gradiente: solución B 20 → 60% (10 min, gradiente lineal); 40ºC; 2 ml/min], el presente compuesto se eluyó a 7,11 min. El compuesto se identificó por análisis espectrométrico de masas ESI de iones negativos (valor calculado: 6552,54; valor medido: 6553,12).

La secuencia de nucleótidos del presente compuesto es complementaria a los nucleótidos Nº 6691-6708 del ADNc de la distrofina (Nº de acceso a Gene Bank NM_004006.1).

(EJEMPLO DE REFERENCIA 1) Síntesis de hAON4

hAON4 [FAM-CUG CUU CCU CCA ACC (SEC ID Nº 23); todos los nucleótidos son 2'-O-metilnucleótidos y están enlazados entre sí por un enlace fosforotioato] que se describe en un documento (van Deutekom, J.C.T. et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10, 1547-1554) y se conoce como un oligonucleótido que induce el salto del exón 46, se sintetizó de acuerdo con el documento anterior.

FAM es un grupo de fluorescencia con la siguiente estructura.



FAM

(EJEMPLO DE REFERENCIA 2) Síntesis de hAON6

hAON6 [FAM-GUU AUC UGC UUC CUC CAA CC (SEC ID Nº 24); todos los nucleótidos son 2'-O-metilnucleótidos y están enlazados entre sí por un enlace fosforotioato] que se describe en un documento (van Deutekom, J.C.T. et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10, 1547-1554) y se conoce como un oligonucleótido que induce el salto del exón 46, se sintetizó de acuerdo con el documento anterior.

(EJEMPLO DE REFERENCIA 3)

hAON8 [FAM-GCU UUU CUU UUA GUU GCU GC (SEC ID Nº 25); todos los nucleótidos son 2'-O-metilnucleótidos y están enlazados entre sí por un enlace fosforotioato] que se describe en un documento (van Deutekom, J.C.T. et al. (2001) Hum. Mol. Genet. 10, 1547-1554) y se conoce como un oligonucleótido que induce el salto del exón 46, se sintetizó de acuerdo con el documento anterior.

(EJEMPLO DE ENSAYO) Método para el análisis de la capacidad de inducción del salto de exón por ENA antisentido

Preparación de cultivo primario de células mioblásticas

Se estableció un cultivo primario de células mioblásticas como se describe a continuación.

1. Se cortaron muestras de tejido muscular tomadas del músculo recto del muslo de pacientes con distrofia muscular de Duchenne en trozos finos y se lavaron con PBS dos veces.
2. El tejido muscular de 1 anterior se trató con Difco Bacto™ triptona 250 (solución al 5% en PBS) a 37ºC durante 30 min para obtener de este modo células libres enzimáticamente.
3. Las células libres de 2 anterior se lavaron con DMEM (que contenía FBS al 20%) dos veces.
4. Las células de 3 anterior se suspendieron en DMEM (que contenía FBS al 20% y ultroser G al 4%).
5. Las células en suspensión de 4 se pasaron a través de una malla (Becton Dickinson: filtro celular 35-2360) para recuperar solamente células libres.
6. Las células recuperadas de 5 anterior se sembraron en placas recubiertas con gelatina.
7. Las células se cultivaron a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire.

Inducción de diferenciación

La diferenciación de las células musculares se indujo como se describe a continuación.

1. Las células cultivadas obtenidas anteriormente se sembraron en placas de 6 pocillos (recubiertas con gelatina). Cuando las células se hicieron confluyentes, se intercambió el medio con DMEM (que contenía suero de caballo al 2% (HS)).
2. Después de un cultivo de 4 días, las células se transfectaron con los compuestos preparados en los Ejemplos (ENA) como se describe a continuación.

Transfección de ENA

Las células mioblásticas se transfectaron con los compuestos preparados en los Ejemplos (ENA) como se describe a continuación.

1. Se disolvieron 200 pmol de cada uno de los compuestos preparados en los Ejemplos (10 μg/20 μl de milliQ) en 100 μl de Opti-MEM (GIBCO-BRL).
2. Se añadieron 6 μl de reactivo Plus (GIBCO-BRL) a la solución de 1 anterior, que después se dejó a temperatura ambiente durante 15 min.

3. En otro tubo, se disolvieron 8 μl de Lipofectamina (GIBCO-BRL) en 100 μl de Opti-MEM.
4. Después de completar el tratamiento de 2 anterior, la solución de 3 anterior se añadió a la solución de 2 anterior. La solución resultante se dejó a temperatura ambiente durante otros 15 min.
5. Las células mioblásticas 4 días después del inicio de la inducción de diferenciación se lavaron con PBS una vez. Después, se añadieron 800 μl de Opti-MEM a las mismas.
6. Después de completar el tratamiento de 4 anterior, la solución tratada se añadió a las células de 5 anterior.
7. Las células de 6 anterior se cultivaron a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire durante 3 h. Después, se añadieron 500 μl de DMEM (que contenía HS al 6%) a cada pocillo.
8. Las células se cultivaron adicionalmente.

Extracción de ARN

Se extrajo el ARN como se describe a continuación.

1. Las células transfectadas con ENA se cultivaron durante 2 días y después se calentaron con PBS una vez. A estas células, se añadieron 500 μl de ISOGEN (Nippon Gene).
2. Las células se dejaron a temperatura ambiente durante 5 min, seguido de recuperación de ISOGEN en cada pocillo en tubos.
3. Se extrajo el ARN de acuerdo con el protocolo de ISOGEN (Nippon Gene).
4. Finalmente, se disolvió el ARN en 20 μl de DEPW.

Trascripción inversa

La transcripción inversa se realizó como se describe a continuación.

1. A 2 μg de ARN, se añadió DEPW (agua esterilizada tratada con dietilpirocarbonato) para hacer una solución de 6 μl.
2. A la solución de 1 anterior, se añadieron 2 μl de hexámero aleatorio (Invitrogen: 3 μg/μl de producto se diluyó a factor 20 antes de su uso).
3. La solución resultante se calentó a 65º durante 10 min.
4. Después, la solución se enfrió en hielo durante 2 min.
5. A la solución de reacción anterior, se añadió lo siguiente:

transcriptasa inversa MMLV (Invitrogen: 200 U/μl) 1 μl
inhibidor de ribonucleasa placentaria humana (Takara: 40 U/μl) 1 μl
DTT (adjuntado a transcriptasa inversa MMLV) 1 μl
tampón (adjuntado a transcriptasa inversa MMLV) 4 μl
dNTP (adjuntado a Takara Ex Taq) 5 μl

6. La solución resultante se mantuvo a 37ºC durante 1 h, y después se calentó a 95ºC durante 5 min.
7. Después de la reacción, la solución se almacenó a -80ºC.

Reacción de PCR

La reacción de PCR se realizó como se describe a continuación.

1. Se mezclaron los siguientes componentes y después se calentaron a 94ºC durante 4 min.
Producto de transcripción inversa 3 μl
Cebador directo (10 pmol/μl) 1 μl
Cebador inverso (10 pmol/μl) 1 μl
dNTP (adjuntados a TAKARA Ex Taq) 2 μl
Tampón (adjuntado a TAKARA Ex Taq) 2 μl
Ex Taq (TAKARA) 0,1 μl
Agua esterilizada 11 μl
2. Después del tratamiento mencionado anteriormente a 94ºC durante 4 min, se realizaron 35 ciclos de 94ºC durante 1 min/60ºC durante 1 min/72ºC durante 3 min.
3. Después, la solución de reacción se calentó a 72ºC durante 7 min.
Las secuencias de nucleótidos de los cebadores directo e inverso usados en la PCR para detectar el salto del exón 45 fueron como se describe a continuación.
Cebador directo: 5'-GCT GAA CAG TTT CTC AGA AAG ACA CAA-3' (exón 44) (SEC ID Nº 28) Cebador inverso: 5'-TCC ACT GGA GAT TTG TCT GC-3' (exón 47) (SEC ID Nº 29)
4. El producto de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

El gel resultante se tiñó con bromuro de etidio. La banda resultante (A) (donde estaba saltado un exón) y la banda (B) (donde no estaba saltado un exón) se visualizaron con un dispositivo de fotografiado de gel (Printgraph Modelo AE-6911FXFD; ATTO) y se determinaron cuantitativamente con ATTO Densitograph ver.4.1 para Macintosh. Los valores obtenidos se pusieron en la fórmula A/(A+B)x100 para obtener la eficacia de salto (%). 5. La banda donde había sucedido salto se cortó, y el producto de PCR se subclonó en el vector pT7 Blue-T (Novagen), seguido de reacción de secuenciación con el kit Thermo Sequenase TM II dye terminator cicle sequencing (Amersham Pharmacia Biotec) y la confirmación de la secuencia de nucleótidos con ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los procedimientos de reacción fueron de acuerdo con el manual adjuntado al kit.

[Resultados]

Los resultados del salto del exón 45 se muestran en la Fig. 1. El salto del exón 45 sucedía cuando se usaban los compuestos de los Ejemplos 2 a 5.

(EJEMPLO DE FORMULACIÓN 1)

De acuerdo con la siguiente prescripción, se mezclaron y disolvieron cantidades necesarias de componentes base. A esta solución, se disuelve uno cualquiera de los compuestos de los Ejemplos 1 a 6 o una sal de los mismos para preparar una solución de un volumen específico. La solución resultante se filtra con un filtro de membrana de 0,22 μm de tamaño de poro para obtener de este modo una preparación para administración intravenosa.

Uno cualquiera de los compuestos de los Ejemplos 1 a 6 o una sal de los mismos	500 mg
Cloruro sódico	8,6 g
Cloruro de potasio	0,3 g
Cloruro de calcio	0,33 g
Agua destilada para inyección	para dar un volumen total de 1000 ml

(EJEMPLO DE FORMULACIÓN 2)

De acuerdo con la siguiente prescripción, se mezclaron y disolvieron cantidades necesarias de componentes base. A esta solución, se disuelve uno cualquiera de los compuestos de los Ejemplos 1 a 6 o una sal de los mismos para preparar una solución de un volumen específico. La solución resultante se filtra con un filtro de 15 nm de tamaño de poro (PLANOVE 15: Asahi Kasei) para obtener de este modo una preparación para administración intravenosa.

Uno cualquiera de los compuestos de los Ejemplos 1 a 6 o una sal de los mismos	100 mg
Cloruro sódico	8,3 g
Cloruro de potasio	0,3 g
Cloruro de calcio	0,33 g
Hidrogenofosfato sódico · $12H_2O$	1,8 g
1N HCl	cantidad apropiada (pH 7,4)
Agua destilada para inyección	para dar un volumen total de 1000 ml

(EJEMPLO DE FORMULACIÓN 3)

De acuerdo con la siguiente prescripción, se mezclaron y disolvieron cantidades necesarias de componentes base. A esta solución, se disuelve uno cualquiera de los compuestos de los Ejemplos 1 a 6 o una sal de los mismos para preparar una solución de un volumen específico. La solución resultante se filtra con un filtro de 35 nm de tamaño de poro (PLANOVE 35: Asahi Kasei) para obtener de este modo una preparación para administración intravenosa.

Uno cualquiera de los compuestos de los Ejemplos 1 a 6 o una sal de los mismos	100 mg
Cloruro sódico	8,3 g
Cloruro de potasio	0,3 g
Cloruro de calcio	0,33 g
Glucosa	0,4 g
Hidrogenofosfato sódico · $12H_2O$	1,8 g
1N HCl	cantidad apropiada (pH 7,4)
Agua destilada para inyección	para dar un volumen total de 1000 ml

Aplicabilidad industrial

Los compuestos de la presente invención y sales farmacológicamente aceptables de los mismos tienen un efecto de inducir el salto del exón 45 del gen de la distrofina y por tanto son útiles como agentes farmacéuticos para tratar la distrofia muscular.

Texto de libre de lista de secuencias

La SEC ID Nº 10 muestra la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido preparado en el Ejemplo 1 (AO20). La SEC ID Nº 14 muestra la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido preparado en el Ejemplo 2 (AO33). La SEC ID Nº 15 muestra la secuencia de nucleótidos de los oligonucleótidos preparados en los Ejemplos 3 y 6 (AO85 y SO88). La SEC ID Nº 16 muestra la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido preparado en el Ejemplo 4 (AO86). La SEC ID Nº 17 muestra la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido preparado en el Ejemplo 5 (AO87). La SEC ID Nº 23 muestra la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido preparado en el Ejemplo de referencia 1. La SEC ID Nº 24 muestra la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido preparado en el Ejemplo de referencia 2. La SEC ID Nº 25 muestra la secuencia de nucleótidos del oligonucleótido preparado en el Ejemplo de referencia 3. La SEC ID Nº 28 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador directo (para la reacción de PCR para detectar el salto del exón 45) usado en el Ejemplo de ensayo 2. La SEC ID Nº 29 muestra la secuencia de nucleótidos del cebador inverso (para la reacción de PCR para detectar el salto del exón 45) usado en el Ejemplo de ensayo 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kobe University SANKYO CO., LTD.

<120> Fármacos de ácido nucleico ENA capaces de modificar el corte y empalme en precursores de ARNm

<130> N94646A

<150> JP 2002-340857
<151> 25-11-2002

<150> JP 2003-204381
<151> 31-07-2003

<160> 88

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1
<211> 31
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 1
gcctgagctg atctgctggc atcttgcagt t 31

<210> 2
<211> 15
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 2
gatctgctgg catct 15

<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 3
gatctgctgg catcttgcag tt 22

<210> 4
<211> 19
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 4
agctgatctg ctggcatct 19

<210> 5
<211> 24

<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 5
gcctgagctg atctgctggc atct 24

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 6
gatctgctgg catcttgcag 20

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 7
gatctgctgg catcttgc 18

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 8
gcatgctcaa gaggaacttc c 21

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 9
tagcaactgg cagaattcga t 2

<210> 10
<211> 23
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 10
agttgagtct tcgaaactga gca

<210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 11
aaactgagca aatttgct 18

<210> 12
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 12
ttgagtcttc aaaactga 18

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 13

gtgcaaagtt gagtcttc 18

<210> 14
<211> 15
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 14
gccgctgccc aatgc 15

<210> 15
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 15
cgctgcccaa tgccatcc 18

<210> 16

<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 16
cagtttgccg ctgcccaa 18

<210> 17
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 17
tgttctgaca acagtttg 18

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 18
gcttttcttt tagttgctgc 20

<210> 19
<211> 22
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 19
cttttagttg ctgctctttt cc 22

<210> 20
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 20
ttttccaggt tcaagtgg 18

<210> 21
<211> 15
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 21

ctgcttcctc caacc 15

<210> 22
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 22
gttatctgct tcctccaacc 20

<210> 23
<211> 15
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 23
cugcuuccuc caacc 15

<210> 24
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 24
guuaucugcu uccuccaacc 20

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 25
gcuuuucuuu uaguugcugc 20

<210> 26
<211> 24
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 26
ggtatcagta caagaggcag gctg 24

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 27
cacttctaat agggcttgtg 20

<210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 28
gctgaacagt ttctcagaaa gacacaa 27

<210> 29
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 29
tccactggag atttgtctgc 20

<210> 30
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 30
gaaaacgccg ccatuuct 18
<210> 31 <211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 31
ctgutagcca ctgattaa 18

<210> 32
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 32
tgagaaactg tucagcut 18

<210> 33
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 33
caggaattug tgucuutc 18

<210> 34
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 34
gtauttagca tgutccca 18

<210> 35
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 35

agcatgttcc caatuctc 18
<210> 36
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 36
gccgccatuu cucaacag 18

<210> 37
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 37
cataatgaaa acgccgcc 18

<210> 38
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 38
tucccaatuc tcaggaat 18

<210> 39
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 39
ccautugtau ttagcatg 18

<210> 40
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 40
ctcagatcuu ctaacuuc 18
<210> 41

<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 41
accgcctucc actcagag 18

<210> 42
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 42
tcttgaagta aacggtut 18

<210> 43
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 43
ggctgcttug ccctcagc 18

<210> 44
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 44
agtccaggag ctaggtca 18

<210> 45
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 45
gctccaatag tggtcagt 18

<210> 46
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 46

gctaggtcag gctgcttu 18

<210> 47
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 47
gcagccuctc gctcactc 18

<210> 48
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 48
tcuuccaaag cagccuct 18

<210> 49
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 49
tgcagtaatc uatgagtt 18

<210> 50
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 50
gttucagcut ctgtaagc 18

<210> 51
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 51
tgtaggacat tggcagtt 18

<210> 52
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 52
tccttacggg tagcaucc 18

<210> 53 <211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 53
agctcututa ctcccttg 18

<210> 54
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 54
ccautgutuc aucagctc 18

<210> 55

<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 55
ctatgagttt cttccaaa 18

<210> 56
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 56
tgtgtcacca gaguaacagt 20

<210> 57
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 57
aggttguguc accagagtaa 20

<210> 58
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 58
agtaaccaca gguugtgtca 20

<210> 59
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 59
ttgatcaagc agagaaagcc 20

<210> 60
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 60
cacccucugu gauuutataa 20

<210> 61
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 61
acccaccauc acccuctgtg 20

<210> 62
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 62
cctcaagguc acccaccatc 20

<210> 63
<211> 18
<212> ADN

<213> oligonucleótido sintético

<400> 63
taacagucug aguaggag 18

<210> 64
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 64
ggcatuucua guutggag 18

<210> 65
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 65
agccagucgg uaagttct 18

<210> 66
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 66
agtttggaga uggcagtt 18

<210> 67
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 67
ctgattctga attcuutc 18

<210> 68
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 68
ttcttgtact tcatccca 18

<210> 69
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 69
ccuccggttc tgaaggtg 18

<210> 70
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 70
cattucautc aactgttg 18

<210> 71
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 71
ttccttagct uccagcca 18

<210> 72
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 72
taagacctgc tcagcutc 18

<210> 73
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 73
cttggctctg gcctgucc 18

<210> 74
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 74
ctcctuccat gactcaag 18

<210> 75 <211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 75
ctgaaggtgt tcttgtac 18

<210> 76
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 76
ttccagccat tgtgttga 18

<210> 77
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 77
ctcagctuct tccttagc 18

<210> 78
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 78
gcttcutccu tagcutcc 18

<210> 79
<211> 22
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 79
tagtctacaa caaagctcag gt 22

<210> 80
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 80
cttccccagt tgcattcaat 20

<210> 81
<211> 21
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 81
caaggagaaa ttgaagctca a 21

<210> 82
<211> 23
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 82
cgatccgtaa tgattgttct agc 23

<210> 83
<211> 21
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 83
tggacagaac ttaccgactg g 21

<210> 84
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 84
ggcggaggtc tttggccaac 20

<210> 85
<211> 22
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 85
aaggattcaa cacaatggct gg 22

<210> 86
<211> 20
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 86
gtaacaggac tgcatcatcg 20

<210> 87
<211> 18
<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 87
ggcattucta guttggag 18

<210> 88
<211> 18

<212> ADN
<213> oligonucleótido sintético

<400> 88
agtutggaga tggcagtt 18

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto oligonucleotídico capaz de inducir el salto del exón 45 del gen de la distrofina, que es un oligonucleótido representado por la secuencia de nucleótidos mostrada en una cualquiera de las SEC ID Nº 15, 14 y 16 donde al menos uno de los nucleósidos que constituye el oligonucleótido está modificado por 2'-O,4'-C alquilenación de D-ribofuranosa o un compuesto representado por la fórmula general (III'); o una sal farmacológicamente aceptable del mismo, opcionalmente donde al menos uno de los azúcares y/o los fosfatos que constituyen el oligonucleótido está modificado, donde dicha fórmula general (III) se define del siguiente modo:

$$B_{T'3}\text{-}B_{M'3}\text{-}B_{B'3} \qquad \text{(III')}$$

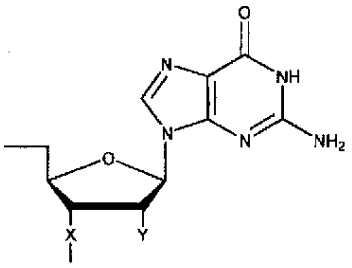
donde $B_{T'3}$ es un grupo representado por uno cualquiera de los siguientes (3a') a (3c'):

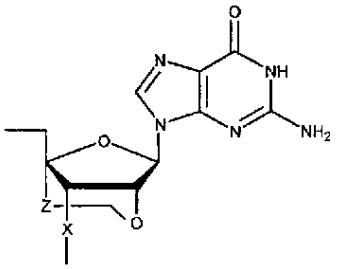
(3a')HO-, (3b')HO-Bc-, o (3c')HO-Bg-Bc-

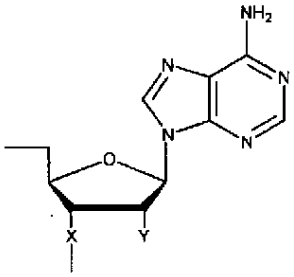
$B_{M'3}$ es un grupo representado por la siguiente fórmula (3'):

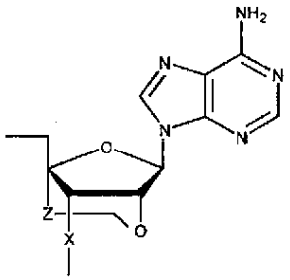
-Bc-Bg-Bc-Bt-Bg-Bc-Bc-Bc-Ba-Ba- (3')

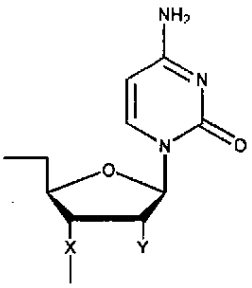
$B_{B'3}$ es un grupo representado por uno cualquiera de los siguientes (32a') a (32i'):
(32a')-CH_2CH_2OH, (32b')-Bt-CH_2CH_2OH,
(32c')-Bt-Bg-CH_2CH_2OH, (32d')-Bt-Bg-Bc-CH_2CH_2OH,
(32e')-Bt-Bg-Bc-Bc-CH_2CH_2OH, (32f')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-CH_2CH_2OH,
(32g')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-Bt-CH_2CH_2OH, (32h')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-Bt-Bc-CH_2CH_2OH, o
(32i')-Bt-Bg-Bc-Bc-Ba-Bt-Bc-Bc-CH_2CH_2OH,
donde Bg es un grupo representado por la siguiente fórmula (G1) o (G2); Ba es un grupo representado por la siguiente fórmula (A1) o (A2); Bc es un grupo representado por la siguiente fórmula (C1) o (C2); y Bt es un grupo representado por la siguiente fórmula (U1) o (T2):

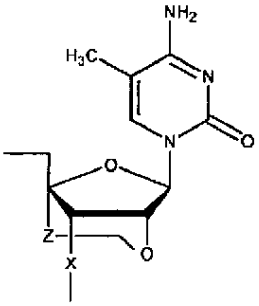

(G1)

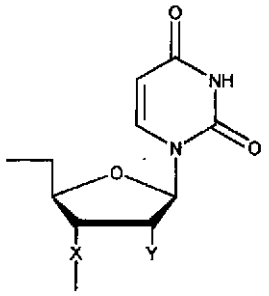

(G2)


(A1)

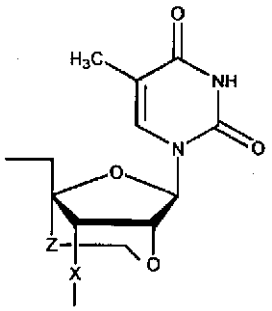

(A2)


(C1)


(C2)

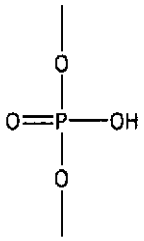


(U 1)

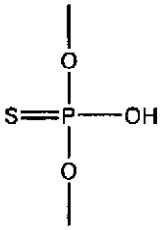


(T 2)

donde X es individual e independientemente un grupo representado por la siguiente fórmula (X1) o (X2):



(X 1)



(X 2)

Y es individual e independientemente un átomo de hidrógeno, un grupo hidroxilo o un grupo alcoxi con 1-6 átomos de carbono; y Z es individual e independientemente un enlace sencillo o un grupo alquileno con 1-5 átomos de carbono; con la condición de que al menos uno de los nucleósidos que constituyen el compuesto representado por la fórmula (III') tenga un grupo 2'-O,4'-C-alquileno.

2. El compuesto o sal farmacológicamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1 donde el azúcar que constituye el oligonucleótido es D-ribofuranosa y la modificación del azúcar es 2'-O-alquilación y/o 2'-O,4'-C-alquilenación de la D-ribofuranosa.

3. El compuesto o sal farmacológicamente aceptable de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, donde la modificación del fosfato es tioación del grupo fosfato.

4. El compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está representado por una cualquiera de las fórmulas seleccionadas entre el grupo que consiste en (A033), (AO85 (AO88) y (AO86), o una sal farmacológicamente aceptable de los mismos

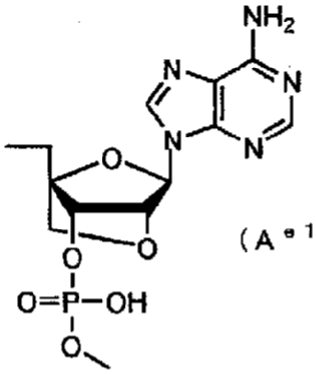
(AO33): HO-G^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-U^{mp}-G^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-C^{mp}-A^{e2p}-A^{e2p}-T^{e2p}-G^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 14)

(AO85): HO-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-U^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 15)

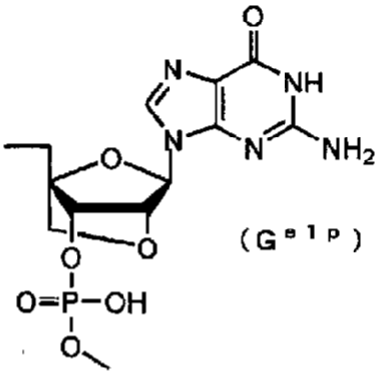
(AO88): HO-C^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-A^{ms}-T^{e2s}-G^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-A^{ms}-U^{ms}-C^{e2s}-C^{e2s}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 15)

(AO86): HO-C^{e2p}-A^{mp}-G^{mp}-T^{e2p}-T^{e2p}-U^{mp}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-T^{e2p}-G^{mp}-C^{e2p}-C^{e2p}-C^{e2p}-A^{mp}-A^{mp}-CH_2CH_2OH (SEC ID Nº 16)

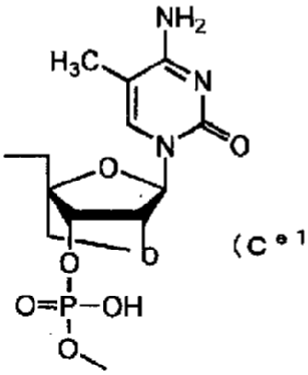
donde A^{e1p}, G^{e1p}, C^{e1p}, T^{e1p}, A^{e2p}, G^{e2p}, C^{e2p}, T^{e2p}, A^{mp}, G^{mp}, C^{mp}, U^{mp}, A^{e1s}, G^{e1s}, C^{e1s}, T^{e1s}, A^{e2s}, G^{e2s}, C^{e2s}, T^{e2s}, A^{ms}, G^{ms}, C^{ms}, y U^{ms} son grupos que tienen las siguientes estructuras, respectivamente:



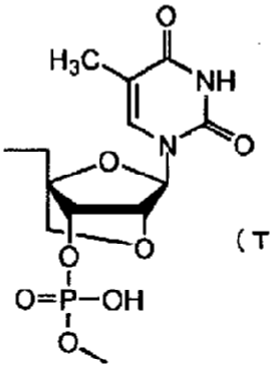
(A e1p)



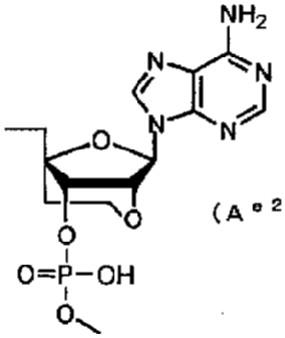
(G e1p)



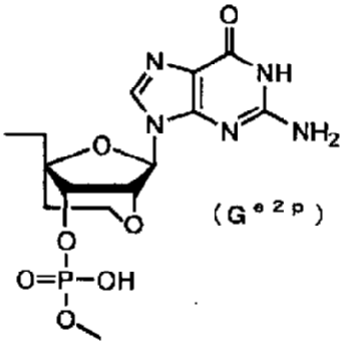
(C e1p)



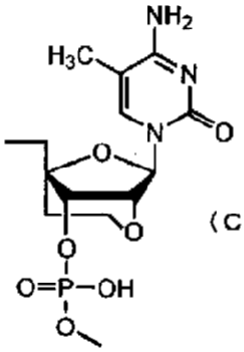
(T e1p)



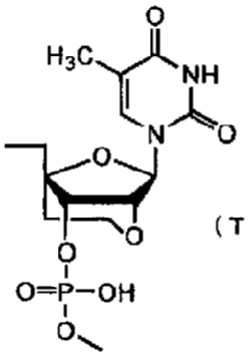
(A e2p)



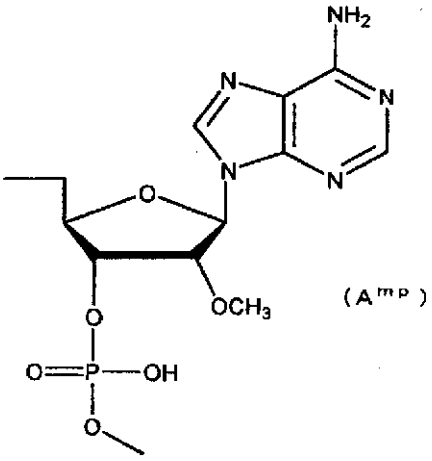
(G e2p)



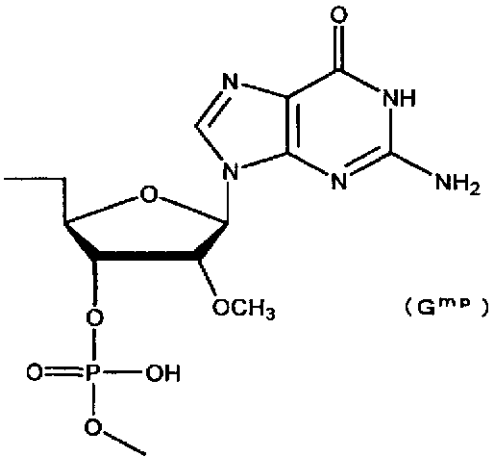
(C e2p)



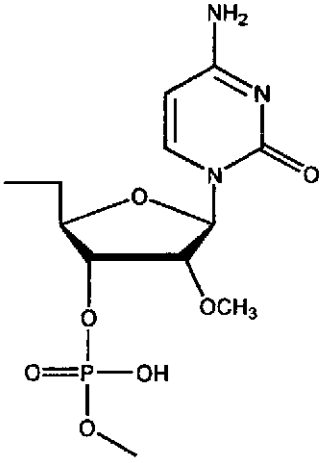
(T e2p)



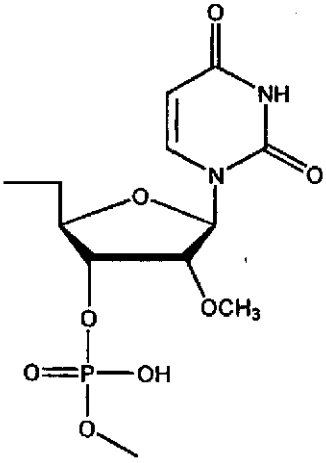
(A^mp)



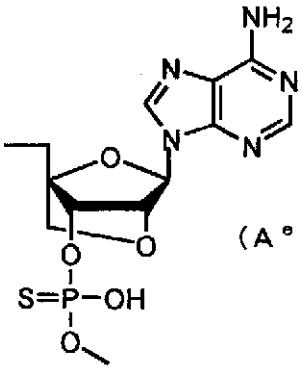
(G^mp)



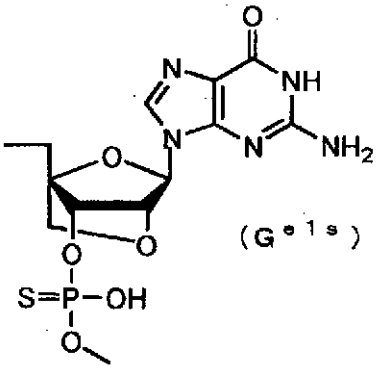
(C^mp)



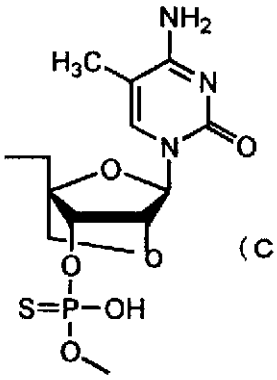
(U^mp)



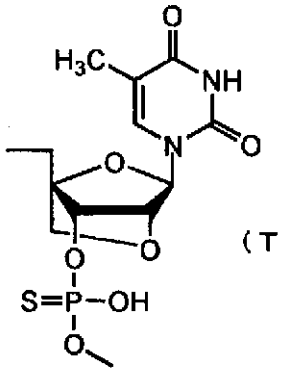
(A^e1s)



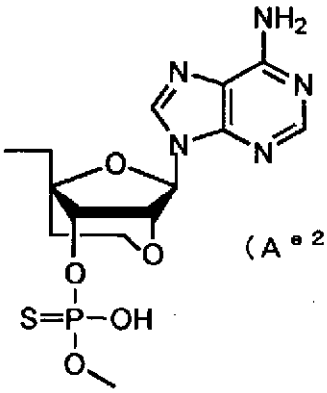
(G^e1s)



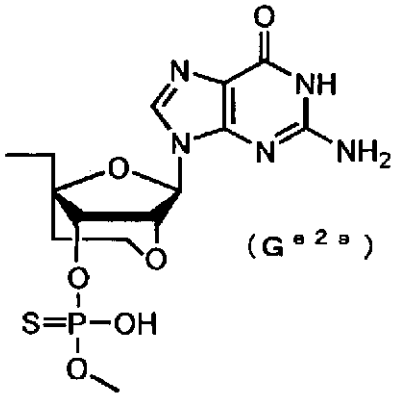
(C^{e1s})



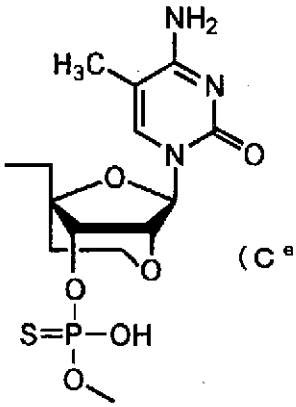
(T^{e1s})



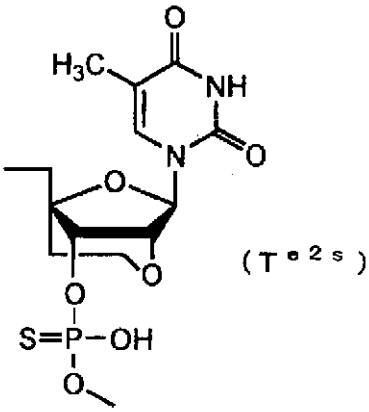
(A^{e2s})



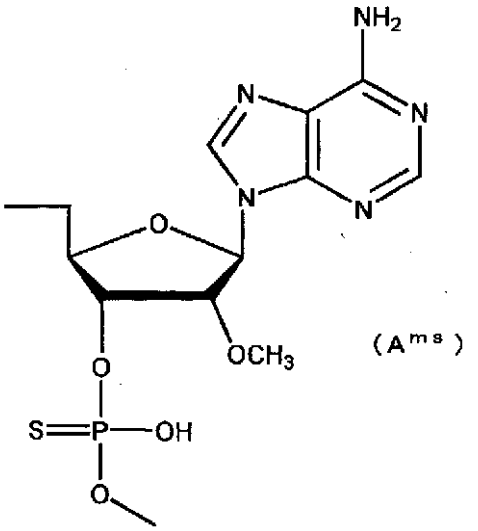
(G^{e2s})



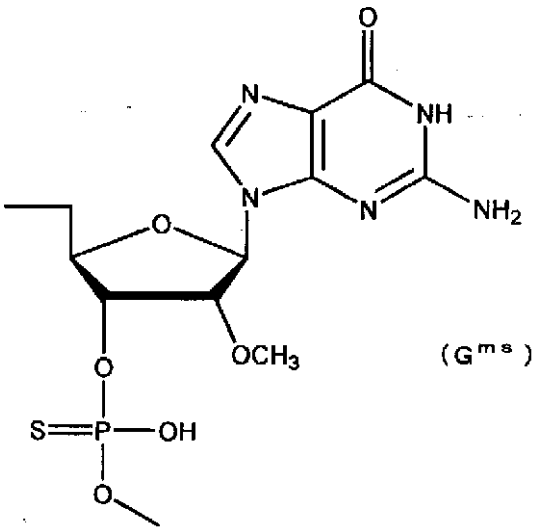
(C^{e2s})



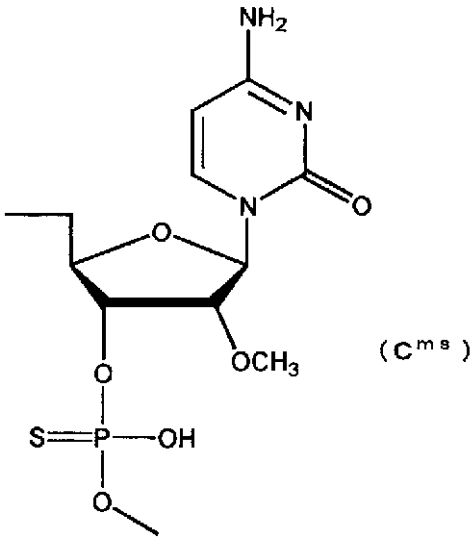
(T^{e2s})



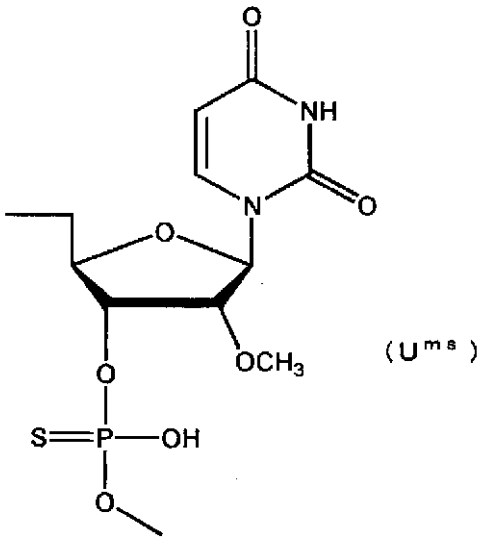
(A^{ms})



(G^{ms})



(C^{ms})



(U^{ms})

5. Un agente terapéutico para la distrofia muscular, que comprende el compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o una sal farmacológicamente aceptable del mismo.

6. El agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5, cuya diana de tratamiento es aquellos pacientes en los que la cantidad total de aminoácidos en la fase de lectura abierta del gen de la distrofina será un múltiplo de 3 cuando el exón 45 del gen de la distrofina se ha saltado.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o un agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6 para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular.

8. Uso de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en la fabricación de un medicamento para tratar la distrofia muscular.

9. Uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde la diana de tratamiento es aquellos pacientes en que la cantidad total de aminoácidos en la fase de lectura abierta del gen de la distrofina será un múltiplo de 3 cuando el exón 45 del gen de la distrofina se ha saltado.

10. Un agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 5 ó 6, un compuesto o agente terapéutico de acuerdo con la reivindicación 7 o un uso de acuerdo con la reivindicación 8 ó 9 donde dicha distrofia muscular es distrofia muscular de Duchenne.

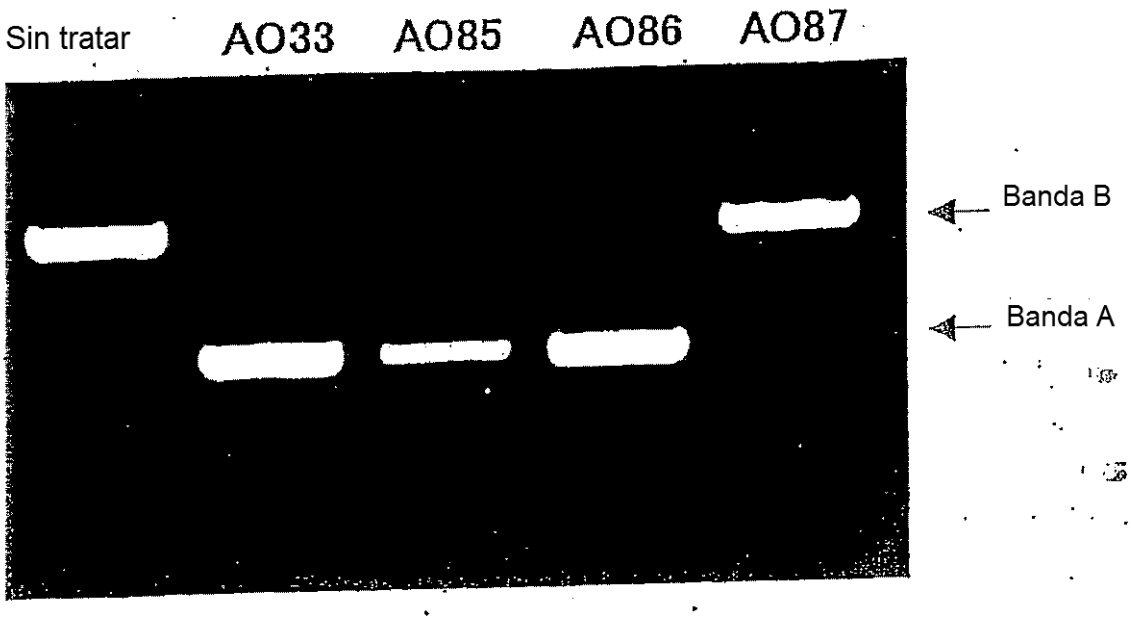



FIG. 1