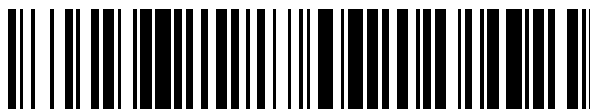


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 710 802**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 31/711 (2006.01)
A61K 31/712 (2006.01)
A61K 31/7125 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2015** **PCT/JP2015/057180**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015** **WO15137409**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2015** **E 15761392 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018** **EP 3118311**

54 Título: **Ácido nucleico antisentido**

30 Prioridad:

12.03.2014 JP 2014048897

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.04.2019

73 Titular/es:

**NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND
PSYCHIATRY (50.0%)
4-1-1, Ogawahigashi-cho, Kodaira-shi
Tokyo 187-8551, JP y
NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WAKAYAMA TATSUSHI;
SEO HARUNA;
SATOY YOUHEI;
TAKEDA SHIN'ICHI y
NAGATA TETSUYA**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 710 802 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico antisentido

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana, y una composición farmacéutica que comprende el oligómero.

10 Antecedentes

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más frecuente de distrofia muscular progresiva hereditaria que afecta a uno de cada 3.500 niños recién nacidos. Aunque las funciones motoras rara vez son diferentes a las de los humanos sanos en la infancia y la niñez, la debilidad muscular se observa en niños de aproximadamente 4 a 5 años de edad. Después, la debilidad muscular progresa hacia la pérdida de la movilidad alrededor de los 12 años y la muerte por insuficiencia cardíaca o respiratoria a los veinte años. La DMD es un trastorno tan grave. Actualmente, no existe una terapia eficaz para la DMD disponible, y se desea fuertemente desarrollar un novedoso agente terapéutico.

Se sabe que la DMD tiene como causa una mutación en el gen de la distrofina. El gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X y es un gen enorme que consta de 2,2 millones de pares de nucleótidos de ADN. El ADN se transcribe en precursores de ARNm, y los intrones se eliminan mediante corte y empalme para sintetizar un ARNm de 11.058 bases, en el que 79 exones se unen. Este ARNm se traduce en 3.685 aminoácidos para producir la proteína distrofina. La proteína distrofina se asocia con el mantenimiento de la estabilidad de la membrana en las células musculares y es necesaria para que las células musculares sean menos frágiles. El gen de la distrofina de pacientes con DMD contiene una mutación y por lo tanto, la proteína distrofina, que es funcional en las células musculares, rara vez se expresa. Por lo tanto, la estructura de las células musculares no puede mantenerse en el cuerpo de los pacientes con DMD, lo que conduce a un gran influxo de iones de calcio en las células musculares. Consecuentemente, se produce una respuesta similar a la inflamación para promover la fibrosis de manera que las células musculares solo pueden regenerarse con dificultad.

La distrofia muscular de Becker (BMD) también es causada por una mutación en el gen de la distrofina. Los síntomas involucran debilidad muscular acompañada de atrofia muscular pero típicamente son leves y lentos en el progreso de la debilidad muscular, en comparación con la DMD. En muchos casos, su inicio es en la edad adulta. Se considera que las diferencias en los síntomas clínicos entre la DMD y la BMD residen en si el marco de lectura para los aminoácidos en la traducción del ARNm de la distrofina en la proteína distrofina se interrumpe por la mutación o no (Documento que no es patente 1). Más específicamente, en la DMD, la presencia de la mutación cambia el marco de lectura de los aminoácidos de manera que se suprime la expresión de la proteína distrofina funcional, mientras que en la BMD la proteína distrofina que funciona, aunque de manera imperfecta, se produce porque se conserva el marco de lectura de los aminoácidos, mientras que una parte de los exones se eliminan por la mutación.

Se espera que la omisión de exón sirva como un método para tratar la DMD. Este método implica modificar el corte y empalme para restaurar el marco de lectura de aminoácidos del ARNm de la distrofina e inducir la expresión de la proteína distrofina que tiene la función parcialmente restaurada (Documento que no es patente 2). La parte de la secuencia de aminoácidos, que es un objetivo para la omisión de exones, se perderá. Por esta razón, la proteína distrofina expresada por este tratamiento se vuelve más corta que la normal pero como el marco de lectura de aminoácidos se mantiene, la función para estabilizar las células musculares se retiene parcialmente. Consecuentemente, se espera que la omisión de exón conduzca a la DMD a síntomas similares a los de la BMD que es más leve. El enfoque de omisión de exón pasó las pruebas en animales con ratones o perros y ahora se evalúa en ensayos clínicos en pacientes humanos con DMD.

La omisión de un exón puede inducirse mediante la unión de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen al sitio de corte y empalme 5' o 3' o ambos sitios, o sitios internos de los exones. Sólo se incluirá un exón en el ARNm cuando el complejo del espliceosoma reconozca sus dos sitios de corte y empalme. Así, la omisión de exón puede inducirse mediante la fijación como objetivos de los sitios de corte y empalme con ácidos nucleicos antisentido. Además, la unión de una proteína SR a un potenciador de del corte y empalme exónico (ESE) se considera necesaria para que un exón se reconozca por el mecanismo de corte y empalme. Consecuentemente, la omisión de exón también puede inducirse mediante la fijación como objetivo del ESE.

Dado que una mutación del gen de la distrofina puede variar en dependencia de los pacientes con DMD, los ácidos nucleicos antisentido deben diseñarse basados en el sitio o el tipo de mutación genética respectiva. En el pasado, los ácidos nucleicos antisentido que inducen la omisión de exón para los 79 exones se produjeron por Steve Wilton, y otros, Universidad de Australia Occidental (Documento que no es patente 3), y los ácidos nucleicos antisentido que inducen la omisión de exón para 39 exones se produjeron por Annemieke Aartsma-Rus, y otros, Holanda (Documento que no es patente 4).

Se considera que aproximadamente el 13 % de todos los pacientes con DMD pueden tratarse por omisión del exón 51 (de aquí en adelante denominado "exón 51"). En los últimos años, una pluralidad de organizaciones de investigación informaron sobre los estudios en los que el exón 51 en el gen de la distrofina fue objeto de omisión de exón (Documentos

de patentes del 1 al 7; documentos que no son patentes del 5 al 6). Sin embargo, todavía no se establece una técnica de omisión del exón 51 con una alta eficiencia.

La patente núm. WO2010/048586A1 describe un compuesto antisentido que contiene 20-35 subunidades de morfolino para omitir el exón 51 del ARNm preprocesado de distrofina humana mientras que la patente núm. WO2011/154427A1 describe un ácido nucleico que codifica un pequeño ARN nuclear (snRNA) capaz de hibridar con las uniones de los sitios de corte y empalme 5' y 3' y con al menos un potenciador de empalme exónico del exón 45 o el exón 51 del pre ARNm de la distrofina.

Documento de la técnica anterior

Documento de patente

Documento de patente 1: Publicación internacional núm. WO 2004/048570
Documento de patente 2: Publicación internacional núm. WO 2002/024906
Documento de patente 3: Publicación internacional núm. WO 2010/048586
Documento de patente 4: Publicación internacional núm. WO 2010/050801
Documento de patente 5: Patente de los EE.UU. núm. US 2010/0168212
Documento de patente 6: Publicación internacional núm. WO2010/048586A1
Documento de patente 7: Publicación internacional núm. WO2011/154427A1

Documento que no es patente 1: Monaco A. P. y otros, Genomics 1988; 2: pág. 90-95
Documento que no es patente 2: Matsuo M., Brain Dev 1996; 18: pág. 167-172
Documento que no es patente 3: Wilton S. D., y otros, Molecular Therapy 2007; 15: pág. 1288-96
Documento que no es patente 4: Annemieke Aartsma-Rus y otros, (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77
Documento que no es patente 5: Aoki Y., y otros, Molecular therapy 2010; 18: pág. 1995-2005
Documento que no es patente 6: Nakano S., y otros, Pediatr Int. 2011; 53: 524-429

Descripción de la invención

Problemas a resolver por la invención

En las circunstancias anteriores, se deseaban oligómeros antisentido que indujeran la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina con una alta eficacia y productos terapéuticos de la distrofia muscular que comprenden oligómeros de estos.

Medios para resolver el problema

Como resultado de estudios detallados de los contenidos técnicos de los documentos anteriores y de la estructura del gen de la distrofina, los presentes inventores encontraron que la omisión del exón 51 puede inducirse con una alta eficacia mediante la administración del oligómero antisentido que tiene las secuencias de nucleótidos representadas por la sec. con núm. de ident.: 1 y 2. Con base en este descubrimiento, los presentes inventores lograron la presente invención.

Es decir, la presente invención es la siguiente.

[1] Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en de (a) a (d) a continuación:

(a) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 1 o 2;
(b) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2, y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(c) un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(d) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas a un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

[2] Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en de (e) a (h) a continuación:

(e) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2;

(f) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 3 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2, y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(g) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(h) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones altamente rigurosas a un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

[3] Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en (i) y (j) a continuación:

un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2; y

(j) un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

5 [4] El oligómero antisentido según cualquiera de [1] a [3] anterior, que es un oligonucleótido.

[5] El oligómero antisentido de acuerdo con [4] anterior, en donde se modifica el resto azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido.

[6] El oligómero antisentido de acuerdo con [4] o [5] anteriores, en donde el resto azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo 2'-OH se reemplaza por uno seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br e I (en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquilenilo).

[7] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [4] a [6] anteriores, en donde la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace boranofosfato.

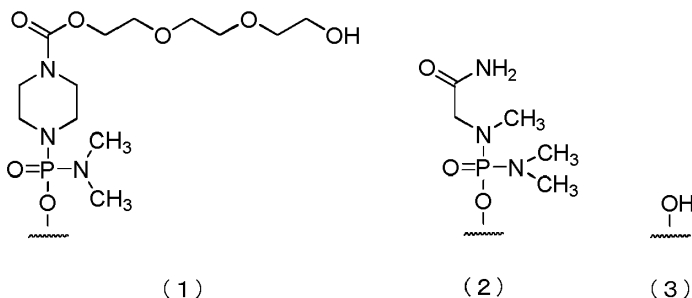
[8] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3] anteriores, que es un oligómero de morfolino.

[9] El oligómero antisentido de acuerdo con [8] anterior, en donde se modifica el resto del anillo de morfolina, la región de unión a fosfato, el extremo 3' y/o el extremo 5' de al menos un morfolino que constituya el oligómero de morfolino.

[10] El oligómero antisentido de acuerdo con [9] o [10] anteriores, en donde la región de unión a fosfato de al menos un morfolino que constituye el oligómero de morfolino es cualquiera seleccionado de un enlace fosforodiamidato, un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace de boranofosfato.

[11] El oligómero antisentido de acuerdo con [10] anterior, que es un oligómero de morfolino fosforodiamidato.

[12] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera del [9] al [11] anteriores, en donde el extremo 5' es cualquiera de las fórmulas químicas de la (1) a la (3) a continuación:



[13] Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como ingrediente activo el oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera del [1] al [12] anteriores, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.

[14] La composición farmacéutica de acuerdo con [13] anterior, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[15] Un método para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende administrar a un paciente con distrofia muscular el oligómero antisentido de acuerdo con una cualquiera de [1] a [12] anteriores o la composición farmacéutica de acuerdo con [13] o [14] anteriores.

45 [16] El método para el tratamiento de acuerdo con [15] anterior, en donde el paciente con distrofia muscular es un paciente con deleciones de nucleótidos dentro de los exones 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 o 47-50.

[17] El método de tratamiento de acuerdo con [15] o [16] anteriores, en donde el paciente es un ser humano.

[18] El uso del oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera del [1] al [12] anteriores en la fabricación de la composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular.

[19] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera del [1] al [12] anteriores, para usar en el tratamiento de la distrofia muscular.

[20] El oligómero antisentido de acuerdo con [19] anterior, en donde el paciente con distrofia muscular en dicho tratamiento es un paciente con deleciones de nucleótidos dentro de los exones 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 o 47-50.

[21] El oligómero antisentido de acuerdo con [19] o [20] anteriores, en donde el paciente es un ser humano.

Efectos de la invención

60 El oligómero antisentido de la presente invención puede inducir la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana con una alta eficacia. Además, los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne pueden aliviarse eficazmente mediante la administración de la composición farmacéutica de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la eficacia de la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomyosarcoma humano (células RD).

Modo de implementar la invención

De aquí en adelante, la presente invención se describe en detalle. Se pretende que las modalidades descritas a continuación se presenten a manera de ejemplo simplemente para describir la invención pero no se limitan únicamente a las siguientes modalidades. La presente invención puede implementarse de varias maneras sin apartarse de la esencia de la invención.

1. Oligómero antisentido

La presente invención proporciona el oligómero antisentido (de aquí en lo adelante denominado "oligómero antisentido de la presente invención") que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana con una alta eficacia.

[Exón 51 en el gen de la distrofina humana]

En la presente invención, el término "gen" pretende significar un gen genómico e incluye, además, ADNc, precursor de ARNm y ARNm. Preferentemente, el gen es un precursor de ARNm, es decir, pre ARNm.

En el genoma humano, el gen de la distrofina humana se localiza en el locus Xp21.2. El gen de la distrofina humana tiene un tamaño de 2,2 millones de pares de nucleótidos y es el gen más grande entre los genes humanos conocidos. Sin embargo, las regiones codificantes del gen de la distrofina humana son solo 14 kb, que se distribuyen en 79 exones a lo largo del gen de la distrofina humana (Roberts, RG, y otros, Genomics, 16: 536-538 (1993)). El pre ARNm, que es la transcripción del gen de la distrofina humana, sufre un corte y empalme para generar un ARNm maduro de 14 kb. Se conoce la secuencia de nucleótidos del gen de la distrofina de tipo salvaje humano (Núm. de acceso del GeneBank NM_004006).

La secuencia de nucleótidos del exón 51 en el gen de la distrofina de tipo salvaje humano se representa por la sec. con núm. de ident.: 3.

[oligómero antisentido]

El oligómero antisentido de la presente invención se diseñó para provocar la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana, y modificar así la proteína codificada por el gen de la distrofina de tipo DMD en la proteína distrofina de tipo BMD. Por consiguiente, el exón 51 en el gen de la distrofina que es el objetivo de la omisión del exón por parte del oligómero antisentido incluye tanto los tipos salvajes como los mutantes.

El oligómero antisentido de la presente invención es específicamente el oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en de (a) a (d) a continuación.

(a) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 1 o 2;

(b) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2, y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(c) un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(d) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas a un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

Los oligómeros antisentido de (b) a (d) son mutantes del oligómero antisentido de (a) en particular y se pretenden que correspondan a mutaciones del gen de la distrofina de los pacientes, por ejemplo, polimorfismo.

Como otra modalidad, el oligómero antisentido de la presente invención es específicamente el oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en de (k) a (n) a continuación.

(k) Un oligómero antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33;

(l) Un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33, y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(m) Un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(n) Un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas a un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

Los oligómeros antisentido de (1) a (n) son mutantes del oligómero antisentido de (k) en particular y se pretende que correspondan a mutaciones, del gen de la distrofina de los pacientes, por ejemplo, polimorfismo.

Además, el oligómero antisentido de la presente invención es el oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en de (o) a (r) a continuación.

(o) Un oligómero antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33;

(p) Un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 3 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33, y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(q) Un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(r) Un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones altamente rigurosas a un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

Además, el oligómero antisentido de la presente invención es el oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en (i) y (j) a continuación:

(i) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33; o

(j) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las sec. con núm. de ident.: de la 6 a la 33 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

Tal como se usa en la presente descripción, el término "oligómero antisentido que hibrida en condiciones rigurosas" se refiere, por ejemplo, a un oligómero antisentido que se obtuvo por hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación Southern o lo similar, mediante el uso como una sonda de todo o parte de un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de, *por ejemplo*, la sec. con núm. de ident.: 1. El método de hibridación que puede usarse incluye métodos descritos en, por ejemplo, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," etc.

Como se usa en la presente descripción, el término "condiciones rigurosas" puede ser cualquiera de las condiciones de baja rigurosidad, condiciones de moderada rigurosidad o condiciones de alta rigurosidad. El término "condición de baja rigurosidad" es, por ejemplo, SSC 5x, solución de Denhardt 5x, 0,5 % de SDS, 50 % de formamida a 32 °C. El término "condición de rigurosidad moderada" es, por ejemplo, SSC 5x, solución de Denhardt 5x, 0,5 % de SDS, 50 % de formamida a 42 °C, o SSC 5x, 1 % de SDS, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 50 % de formamida a 42 °C. El término "condición de alta rigurosidad" es, por ejemplo, (1) SSC 5x, solución de Denhardt 5x, 0,5 % de SDS, 50 % de formamida a 50 °C, (2) SSC 0,2x, 0,1 % de SDS a 60 °C, (3) SSC 0,2x, 0,1 % de SDS a 62 °C, (4) SSC 0,2x, 0,1 % de SDS a 65 °C, o (5) SSC 0,1x, 0,1 % de SDS a 65 °C, pero no se limita a estos. Bajo estas condiciones, se espera que el oligómero antisentido con mayor homología se obtenga de manera eficiente a temperaturas más altas, aunque hay múltiples factores que influyen en la rigurosidad de la hibridación, incluida la temperatura, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, la fuerza iónica, el tiempo, la concentración de sal y otros, y los expertos en la técnica puede seleccionar aproximadamente estos factores para lograr una rigurosidad similar.

Cuando se usan estuches disponibles comercialmente para la hibridación, por ejemplo, puede usarse un sistema Alkphos Direct Labelling and Detection System (GE Healthcare). En este caso, de acuerdo con el protocolo adjunto, después del cultivo con una sonda marcada durante la noche, la membrana se lava con un tampón de lavado primario que contiene SDS al 0,1 % (p/v) a 55 °C, para detectar de esta manera el oligómero antisentido hibridado. Alternativamente, cuando la sonda se marca con digoxigenina (DIG) mediante el uso de un reactivo disponible comercialmente (por ejemplo, una mezcla PCR Labelling Mix (Roche Diagnostics), etc.) para producir una sonda basada en la totalidad o parte de la secuencia complementaria de la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 3, la hibridación puede detectarse con un estuche DIG Nucleic Acid Detection Kit (Roche Diagnostics).

En adición al oligómero antisentido descrito anteriormente, otro oligómero antisentido que puede hibridarse incluye oligómeros antisentido que tienen 90 % o más, 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,1 % o más, 99,2 % o más, 99,3 % o más, 99,4 % o más, 99,5 % o más, 99,6 % o más, 99,7 % o más, 99,8 % o más, y 99,9 % o más de identidad con la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2, según lo calculado por el software de búsqueda de homología tal como FASTA y BLAST mediante el uso de los parámetros predeterminados.

La identidad entre secuencias de nucleótidos puede determinarse mediante el uso de FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) o del algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Se desarrollaron programas llamados blastn, blastx,

tblastn y tblastx basados en el algoritmo BLAST (Altschul SF, y otros: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Cuando una secuencia de nucleótidos se secuencia mediante el uso de blastn, los parámetros son, por ejemplo, puntuación=100 y longitud de palabra=12. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se emplean los parámetros predeterminados para cada programa.

El término "causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana" pretende significar que mediante la unión del oligómero antisentido de la presente invención al sitio correspondiente al exón 51 del transcrito (*por ejemplo*, pre mRNA) del gen de la distrofina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 53 se corta y empalma en la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' del exón 50 en pacientes con DMD con delección del exón 52 cuando el transcrito sufre un corte y empalme, lo que resulta en la formación de un ARNm maduro que está libre de cambio de marco de codón.

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

Si la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana ocurre o no, puede confirmarse mediante la introducción del oligómero antisentido de la presente invención en una célula de expresión de distrofina (*por ejemplo*, células de rabdomiosarcoma humano), mediante la amplificación de la región que rodea el exón 51 del ARNm del gen de la distrofina humana del ARN total de la célula de expresión de la distrofina por RT-PCR y mediante la realización de una PCR anidada o de un análisis de secuencia en el producto amplificado por PCR.

La eficiencia de omisión puede determinarse de la siguiente manera. El ARNm para el gen de la distrofina humana se recolecta de las células de prueba; en el ARNm, el nivel del polinucleótido "A" de la banda donde se omite el exón 51 y el nivel del polinucleótido "B" de la banda donde no se omite el exón 51 se miden. Mediante el uso de estos valores de medición de "A" y "B", la eficiencia se calcula mediante la siguiente ecuación:

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

Preferentemente, el oligómero antisentido de la presente invención causa la omisión del exón 51 con una eficiencia del 10 % o más, 20 % o más, 30 % o más, 40 % o más, 50 % o más, 60 % o más, 70 % o superior, 80 % o superior, y 90 % o más. Para el cálculo de la eficiencia de omisión, puede consultarse la publicación internacional núm. WO2012/029986.

El oligómero antisentido de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido, oligómero de morfolino o ácido nucleico peptídico (PNA), que tiene una longitud de 16 a 35 nucleótidos. La longitud es, preferentemente, de 19 a 32, de 20 a 31, 21 o 30 nucleótidos y se prefieren oligómeros de morfolino.

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

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

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

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

La modificación para las otras posiciones del azúcar incluye, por ejemplo, el reemplazo de O en la posición 4' de la ribosa o desoxirribosa con S, que une entre las posiciones 2' y 4' del azúcar, *por ejemplo*, LNA (ácido nucleico bloqueado) o ENA (ácidos nucleicos con puentes 2'-O,4'-C-etileno), pero no se limita a estos.

Una modificación de la región de unión a fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de la sustitución del enlace fosfodiéster con un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquil fosfonato, un enlace fosforoamidato o un enlace boranofosfato (Enya y otros: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (cf., *por ejemplo*, Reediciones nacionales de Japón de las Solicitudes al PCT núm. 2006/129594 y 2006/038608).

En esta invención, el alquilo es, preferentemente, un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *terc*-pentilo, *n*-hexilo e isohexilo. El alquilo puede sustituirse opcionalmente. Ejemplos de tales sustituyentes son un halógeno, un alcoxi, ciano y nitro. El alquilo puede sustituirse con de 1 a 3 sustituyentes.

En esta invención, el cicloalquilo es, preferentemente, un cicloalquilo que tiene de 5 a 12 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo y ciclododecilo.

En esta invención, el halógeno incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

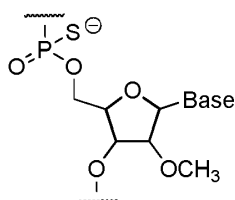
El alcoxi es un alcoxi lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, como metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, *n*-pentiloxi, isopentiloxi, *n*-hexiloxi, isohexiloxi, etc. Entre otros, se prefiere un alcoxi que tiene de 1 a 3 átomos de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

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

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

En esta invención, el acilo incluye un alcanilo o aroilo lineal o ramificado. Los ejemplos de alcanilo incluyen formilo, acetilo, 2-metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, etc. Los ejemplos de aroilo incluyen benzoilo, toluoilo y naftoilo. El aroilo puede sustituirse opcionalmente en posiciones sustituibles y puede sustituirse con un(os) alquilo(s).

Preferentemente, el oligonucleótido de la presente invención es el oligómero antisentido de la presente invención que contiene una unidad constituyente representada por la siguiente fórmula general en donde el grupo -OH en la posición 2' de la ribosa se sustituye con metoxi y la región de unión a fosfato es un enlace fosforotioato:



en donde Base representa una nucleobase.

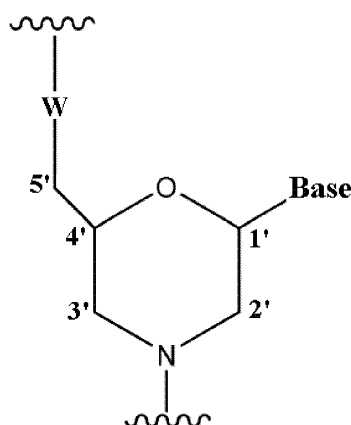
El oligonucleótido de la presente invención puede sintetizarse fácilmente mediante el uso de varios sintetizadores automáticos (*por ejemplo*, oligopilot AKTA plus 10/100 (GE Healthcare)). Alternativamente, la síntesis también puede confiarse a una organización de terceros (*por ejemplo*, Promega Inc., Takara Co., o Japan Bio Service Co.), etc.

El oligómero de morfolino de la presente invención es el oligómero antisentido de la presente invención que comprende la unidad constituyente representada por la siguiente fórmula general:

5

10

15

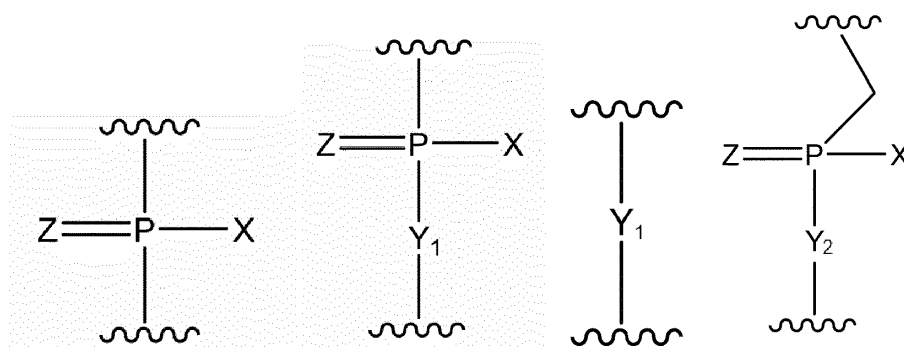


20

en donde la Base tiene el mismo significado que se definió anteriormente, y, W representa un grupo mostrado por cualquiera de los siguientes grupos:

25

30



35

en donde X representa $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{OCH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}^2\text{R}^3$ o F;

R^1 representa H o un alquilo;

R^2 y R^3 , que pueden ser iguales o diferentes, cada uno representa H, un alquilo, un cicloalquilo o un arilo;

Y_1 representa O, S, CH_2 o NR^1 ;

Y_2 representa O, S o NR^1 ;

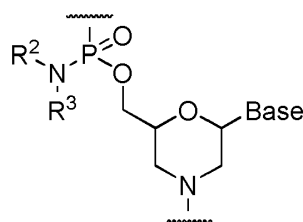
40

Z representa O o S.

Preferentemente, el oligómero de morfolino es un oligómero que comprende una unidad constituyente representada por la fórmula general a continuación (oligómero de morfolino fosforodiamidato (de aquí en adelante denominado como "PMO")).

45

50



55

en donde Base, R^2 y R^3 tienen el mismo significado que se definió anteriormente.

El oligómero de morfolino de la presente invención comprende uno que tiene nucleobases total o parcialmente modificadas, restos de anillo de morfolina, regiones de unión a fosfato, extremo 3' y/o extremo 5' que constituyen el oligómero de morfolino.

60

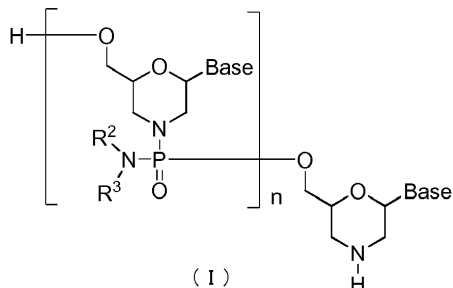
Una modificación de la región de unión a fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de la sustitución con un enlace de fosforodiamidato, un enlace de fosforotioato, un enlace de fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace de fosforamidato y un enlace boranofosfato (Enya y otros: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160)(cf., por ejemplo, Reediciones nacionales de Japón de las aplicaciones del PCT núm. 2006/129594 y 2006/038608).

65

El oligómero de morfolino puede producirse de acuerdo con, *por ejemplo*, la patente núm. WO 1991/009033 o la patente núm. WO 2009/064471. En particular, el PMO puede producirse mediante el procedimiento descrito en la patente núm. WO 2009/064471 o producirse mediante el proceso que se muestra a continuación.

5 [Método para producir PMO]

Una modalidad de PMO es, por ejemplo, el compuesto representado por la fórmula general (I) a continuación (de aquí en adelante PMO (I)).



en donde Base, R² y R³ tienen el mismo significado que se definió anteriormente; y, n es un número entero dado de 1 a 99, preferentemente, un número entero de 24 a 34, de 27 a 31 o de 28 a 30, preferentemente, 29.

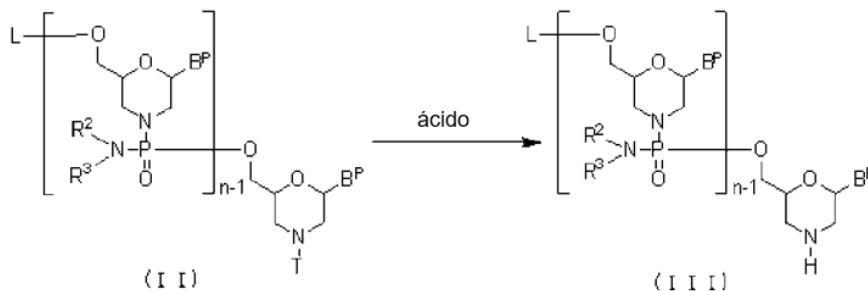
El PMO (I) puede producirse de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, puede producirse mediante la realización de los procedimientos en las siguientes etapas.

Los compuestos y reactivos utilizados en las etapas a continuación no se limitan particularmente siempre que se usan comúnmente para preparar PMO.

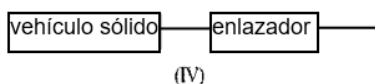
Además, las siguientes etapas pueden llevarse a cabo mediante el método de fase líquida o el método de fase sólida (mediante el uso de sintetizadores automáticos de fase sólida disponibles comercialmente o manuales). Al producir PMO por el método de fase sólida, se desea usar sintetizadores automáticos en vista de procedimientos de operación simples y síntesis precisa.

(1) Etapa A:

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



en donde n, R² y R³ tienen el mismo significado que se definió anteriormente; cada B^P representa independientemente una nucleobase que puede protegerse opcionalmente; T representa tritilo, monometoxitritilo o dimetoxitritilo; y, L representa hidrógeno, un acilo o un grupo representado por la fórmula general (IV) a continuación (de aquí en adelante denominado grupo (IV)).



La "nucleobase" para B^P incluye la misma "nucleobase" que en la Base, siempre que el grupo amino o hidroxilo en la nucleobase mostrada por B^P se proteja. Tal grupo protector para amino no se limita particularmente siempre que se use

como un grupo protector para ácidos nucleicos. Los ejemplos específicos incluyen benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo y (dimetilamino)metileno. Los ejemplos específicos del grupo protector para el grupo hidroxilo incluyen 2-cianoetilo, 4-nitrofenetilo, fenilsulfonietilo, metilsulfonietilo y trimetilsilietilo, y fenilo, que puede sustituirse por de 1 a 5 grupos de extracción de electrones en posiciones sustituibles opcionales, difenilcarbamoilo, dimetilcarbamoilo, dietilcarbamoilo, metilfenilcarbamoilo, 1-pirolidinilcarbamoilo, morfolinocarbamoilo, 4-(terc-butilcarboxi) bencilo, 4-[(dimetilamino)carboxi] bencilo y 4-(fenilcarboxi)bencilo, (cf., *por ejemplo*, *patente núm.* WO 2009/064471).

El "vehículo sólido" no se limita particularmente siempre que sea un vehículo utilizable para la reacción en fase sólida de los ácidos nucleicos. Se desea que el vehículo sólido tenga las siguientes propiedades: *por ejemplo*, (i) es escasamente soluble en reactivos que pueden usarse para la síntesis de derivados de ácido nucleico de morfolino (*por ejemplo*, diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, *N*-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético); (ii) es químicamente estable a los reactivos utilizables para la síntesis de derivados de ácido nucleico de morfolino; (iii) puede modificarse químicamente; (iv) puede cargarse con los derivados de ácido nucleico de morfolino deseados; (v) tiene una resistencia suficiente para soportar alta presión a través de tratamientos; y (vi) tiene un intervalo de diámetro de partícula y distribución uniforme. Específicamente, poliestireno hinchable (*por ejemplo*, resina de aminometil poliestireno 1 % de divinilbenceno reticulado (200-400 mesh) (2,4-3,0 mmol/g) (fabricado por Tokyo Chemical Industry), Resina de poliestireno aminometilado HCl [divinilbenceno 1 %, 100-200 mesh] (fabricado por Peptide Institute, Inc.), poliestireno no hinchable (*por ejemplo*, Primer Support (fabricado por GE Healthcare)), poliestireno unido a la cadena PEG (*por ejemplo*, resina de NH₂-PEG (fabricada por Watanabe Chemical Co.), resina TentaGel), vidrio de poro controlado (vidrio de poro controlado; CPG) (fabricado por, *por ejemplo*, CPG), vidrio de poro controlado con oxalilo (cf., *por ejemplo*, Alul y otros, Nucleic Acids Research, vol. 19, 1527 (1991)), soporte de TentaGel-soporte derivatizado de aminopolietilenglicol (*por ejemplo*, Wright y otros, cf., Tetrahedron Letters, vol. 34, 3373 (1993) y un copolímero de poros-poliestireno/divinilbenceno).

Un "enlazador" que puede usarse es un enlazador conocido que se use generalmente para enlazar ácidos nucleicos o derivados de ácidos nucleicos de morfolino. Los ejemplos incluyen 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dietanosulfonilo y un alquil amino de cadena larga (LCAA).

Esta etapa puede realizarse al hacer reaccionar el Compuesto (II) con un ácido.

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

Puede usarse una amina orgánica en combinación con el ácido descrito anteriormente. La amina orgánica no se limita particularmente e incluye, por ejemplo, trietilamina. La cantidad de amina orgánica utilizada está apropiadamente en un intervalo de, *por ejemplo*, 0,01 equivalentes molares a 10 equivalentes molares y, preferentemente, en un intervalo de 0,1 equivalentes molares a 2 equivalentes molares, basado en 1 mol de ácido.

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

El ácido que puede usarse en esta etapa puede usarse, además, en forma de una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0,1 % a 30 %. El solvente no se limita particularmente en la medida en que es inerte a la reacción e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua o una mezcla de estos.

La temperatura de reacción en la reacción descrita anteriormente está, preferentemente, en un intervalo de *por ejemplo*, 10 °C a 50 °C, con mayor preferencia, en un intervalo de 20 °C a 40 °C, y con la máxima preferencia, en un intervalo de 25 °C a 35 °C.

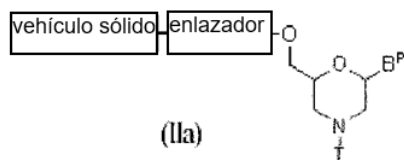
El tiempo de reacción puede variar en dependencia del tipo de ácido usado y la temperatura de reacción, y está en un intervalo apropiado de 0,1 minutos a 24 horas en general y, preferentemente, en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

Después de completar esta etapa, puede adicionarse una base, si es necesario, para neutralizar el ácido que permanece en el sistema. La "base" no se limita particularmente e incluye, por ejemplo, diisopropilamina. La base puede usarse, además, en forma de una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0,1 % (v/v) a 30 % (v/v).

El solvente usado en esta etapa no se limita particularmente siempre que sea inerte a la reacción e incluya diclorometano, acetonitrilo, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua y una mezcla de estos. La temperatura de reacción está, preferentemente, en un intervalo de, *por ejemplo*, 10 °C a 50 °C, con mayor preferencia, en un intervalo de 20 °C a 40 °C, y con la máxima preferencia, en un intervalo de 25 °C a 35 °C.

El tiempo de reacción puede variar según el tipo de base usada y la temperatura de reacción, y está en un intervalo apropiado de 0,1 minutos a 24 horas en general y, preferentemente, en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

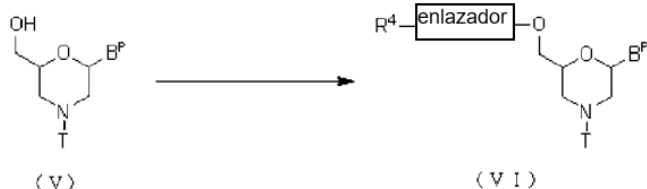
En el Compuesto (II), el compuesto de fórmula general (IIa) a continuación (de aquí en adelante Compuesto (IIa)), en donde n es 1 y L es un grupo (IV), puede producirse mediante el siguiente procedimiento.



en donde B^P , T, el enlazador y el vehículo sólido tienen el mismo significado que se definió anteriormente.

Etapa 1:

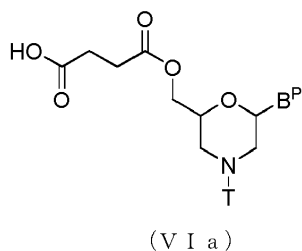
El compuesto representado por la fórmula general (V) a continuación se hace reaccionar con un agente acilante para preparar el compuesto representado por la fórmula general (VI) a continuación (de aquí en adelante denominado Compuesto (VI)).



en donde B^P , T y el enlazador tienen el mismo significado que se definió anteriormente; y, R^4 representa hidroxilo, un halógeno, un grupo carboxilo o amino.

Esta etapa puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos para introducir enlazadores, mediante el uso del Compuesto (V) como material de partida.

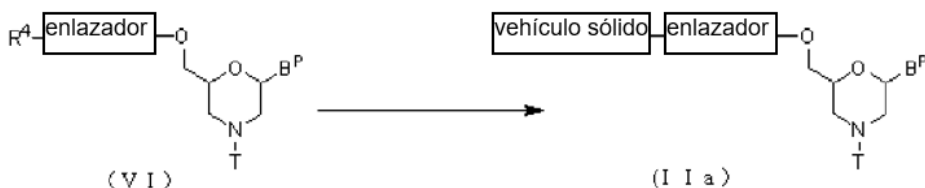
En particular, el compuesto representado por la fórmula general (VIa) a continuación puede producirse al realizar el método conocido como esterificación, mediante el uso del Compuesto (V) y el anhídrido succínico.



en donde B^P y T tienen el mismo significado que se definió anteriormente.

Etapa 2:

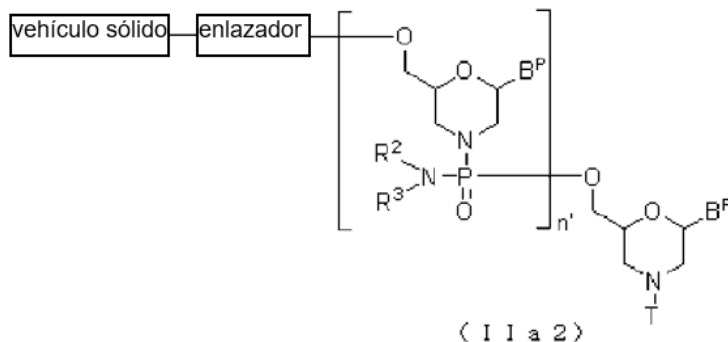
El Compuesto (VI) reacciona con un vehículo sólido por un agente de condensación para preparar el Compuesto (IIa).



en donde B^P , R^4 , T, el enlazador y el vehículo sólido tienen el mismo significado que se definió anteriormente.

Esta etapa puede realizarse mediante el uso del Compuesto (VI) y un vehículo sólido de acuerdo con un proceso conocido como reacción de condensación.

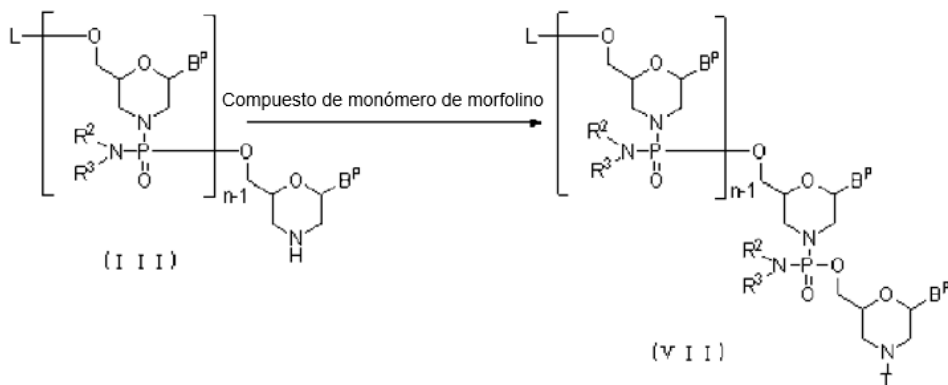
En el Compuesto (II), el compuesto representado por la fórmula general (IIa2) a continuación, donde n es de 2 a 99 (preferentemente, un número entero dado de 25 a 35, de 28 a 32, o de 29 a 31, preferentemente, 30) y L es un grupo representado mediante la fórmula general (IV) puede producirse mediante el uso del Compuesto (IIa) como material de partida y mediante la repetición de la etapa A y la etapa B del método de producción de PMO descrito en la especificación para un número deseado de veces.



en donde B^p, R², R³, T, el enlazador y el vehículo sólido tienen el mismo significado que el definido anteriormente; y, n' representa de 1 a 98 (en una modalidad específica, n' es de 1 a 34, de 1 a 33, de 1 a 32, de 1 a 31, de 1 a 30, de 1 a 29, de 1 a 28, de 1 a 27, de 1 a 26, de 1 a 25, de 1 a 24).

(2) Etapa B

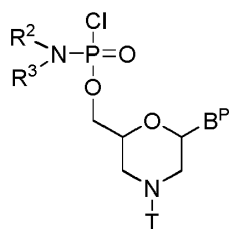
El compuesto (III) se hace reaccionar con un compuesto de monómero de morfolino en presencia de una base para preparar el compuesto representado por la fórmula general (VII) a continuación (de aquí en adelante denominado Compuesto (VII)):



en donde B^p, L, n, R², R³ y T tienen el mismo significado que se definió anteriormente.

Esta etapa puede realizarse al hacer reaccionar el Compuesto (III) con el compuesto de monómero de morfolino en presencia de una base.

El compuesto de monómero de morfolino incluye, por ejemplo, los compuestos representados por la fórmula general (VIII) a continuación:



(VII)

en donde B^P , R^2 , R^3 y T tienen el mismo significado que se definió anteriormente.

La "base" que puede usarse en esta etapa incluye, por ejemplo, diisopropilamina, trietilamina y *N*-etilmorfolina. La cantidad de la base usada está apropiadamente en un intervalo de 1 equivalente molar a 1000 equivalentes molares basados en 1 mol del Compuesto (III), preferentemente, de 10 equivalentes molares a 100 equivalentes molares basados en 1 mol del Compuesto (III).

El compuesto de monómero de morfolino y la base que pueden usarse en esta etapa pueden usarse, además, como una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0,1 % a 30 %. El solvente no se limita particularmente en la medida en que es inerte a la reacción e incluye, por ejemplo, *N,N*-dimetilimidazolidona, *N*-metilpiperidona, DMF, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano o una mezcla de estos.

La temperatura de reacción está, preferentemente, en un intervalo de, *por ejemplo*, de 0 °C a 100 °C, y con mayor preferencia, en un intervalo de 10 °C a 50 °C.

El tiempo de reacción puede variar según el tipo de base utilizada y la temperatura de reacción, y está en un intervalo apropiado de 1 minuto a 48 horas en general y, preferentemente, en un intervalo de 30 minutos a 24 horas.

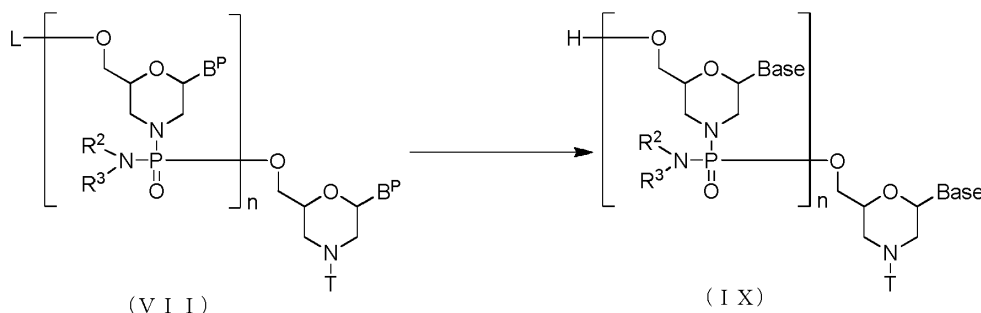
Además, después de completar esta etapa, puede adicionarse un agente acilante, si es necesario. El "agente acilante" incluye, por ejemplo, anhídrido acético, cloruro de acetilo y anhídrido fenoxiacético. El agente acilante puede usarse, además, como una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0,1 % a 30 %. El solvente no se limita particularmente en la medida en que es inerte a la reacción e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano y alcohol(es) (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua o una mezcla de estos.

Si es necesario, una base como piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropiletilamina, *N*-etilmorfolina, etc. puede usarse, además, en combinación con el agente acilante. La cantidad de agente acilante está apropiadamente en un intervalo de 0,1 equivalentes molares a 10000 equivalentes molares y, preferentemente, en un intervalo de 1 equivalente molar a 1000 equivalentes molares. La cantidad de la base está apropiadamente en un intervalo de, *por ejemplo*, 0,1 equivalentes molares a 100 equivalentes molares y, preferentemente, en un intervalo de 1 equivalente molar a 10 equivalentes molares, basado en 1 mol del agente acilante.

La temperatura de reacción en esta reacción está, preferentemente, en un intervalo de 10 °C a 50 °C, con mayor preferencia, en un intervalo de 10 °C a 50 °C, con mucha mayor preferencia, en un intervalo de 20 °C a 40 °C, y con la máxima preferencia, en un intervalo de 25 °C a 35 °C. El tiempo de reacción puede variar según el tipo de agente acilante usado y la temperatura de reacción, y está en un intervalo apropiado de 0,1 minutos a 24 horas en general y, preferentemente, en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

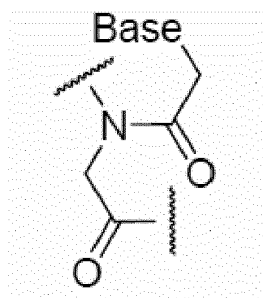
(3) Etapa C:

En el Compuesto (VII) producido en el Paso B, el grupo protector se elimina mediante el uso de un agente de desprotección para preparar el compuesto representado por la fórmula general (IX).



(VII)

(IX)

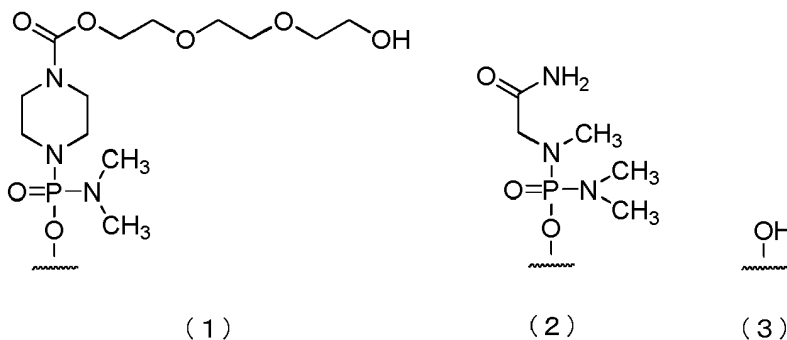


en donde la Base tiene el mismo significado que se definió anteriormente.

Los ácidos nucleicos peptídicos pueden prepararse según la referencia de, *por ejemplo*, las siguientes literaturas.

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

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



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

2. Composición farmacéutica

El oligómero de la presente invención provoca la omisión del exón 51 con una mayor eficacia en comparación con los oligómeros antisentido de la técnica anterior. Así, se espera que las condiciones de distrofia muscular puedan aliviarse con una alta eficiencia mediante la administración de la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención a pacientes con DMD, que tienen una mutación que se convierte a en marco al omitir el exón 51, por ejemplo, pacientes con delección del exón 29-50, pacientes con delección del exón 50, pacientes con delección del exón 45-50, pacientes con delección del exón 48-50, pacientes con delección del exón 49-50, pacientes con delección del exón 52, pacientes con delección del exón 52-63, pacientes con delección del exón 13-50, pacientes con delección del exón 19-50, pacientes con delección del exón 43-50, o pacientes con delección del exón 47-50. Por ejemplo, cuando se usa la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención, pueden lograrse los mismos efectos terapéuticos incluso en una dosis más pequeña que la de los oligómeros de la técnica anterior. Consecuentemente, los efectos secundarios pueden aliviarse y esto es económico.

En otra modalidad, la presente invención proporciona la composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como ingrediente activo el oligómero de la presente invención, una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este (de aquí en adelante denominada "la composición de la presente invención").

Además, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende administrar a un paciente con DMD el oligómero de la presente invención.

En dicho método de tratamiento, el oligómero de la presente invención puede administrarse como la composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular.

Además, la presente invención proporciona el uso del oligómero de la presente invención en la fabricación de la composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular y el oligómero de la presente invención aplicado para el tratamiento de la distrofia muscular.

5 Ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención son sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, potasio y litio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio; sales metálicas tales como sales de aluminio, hierro, zinc, cobre, níquel, cobalto, etc.; sales de amonio; sales de aminas orgánicas tales como sales de t-octilamina, dibencilamina, morfolina, glucosamina, éster alquílico de fenilglicina, etilendiamina, *N*-metilglucamina, guanidina, dietilamina, trietilamina, diciclohexilamina, *N*, *N'*-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, procaína, dietanolamina, *N*-bencilfenetilamina, piperazina, tetrametilamonio, tris(hidroximetil)aminometano; sales de hidrohaluro tales como sales de hidrofluoratos, hidrocioruros, bromhidratos e hidroyoduros; sales de ácidos inorgánicos tales como nitratos, percloratos, sulfatos, fosfatos, etc.; sulfonatos de alcano inferior tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; arilsulfonatos tales como bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartaratos, oxalatos, maleatos, etc.; y sales de aminoácidos tales como sales de glicina, lisina, arginina, ornitina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estas sales pueden producirse por métodos conocidos. Alternativamente, el oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención puede estar en forma de un hidrato de este.

20 La vía de administración para la composición de la presente invención no se limita particularmente siempre que sea una vía de administración farmacéuticamente aceptable, y puede elegirse en dependencia del método de tratamiento. En vista de la facilidad de administración en los tejidos musculares, se prefieren la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular, la administración subcutánea, la administración oral, la administración de tejidos, la administración transdérmica, etc. Además, las formas de dosificación que están disponibles para la composición de la presente invención no se limitan particularmente, e incluyen, por ejemplo, diversas inyecciones, agentes orales, gotas, inhalaciones, pomadas, lociones, etc.

30 En la administración del oligómero de la presente invención a pacientes con distrofia muscular, la composición de la presente invención puede contener un vehículo para promover el suministro del oligómero a los tejidos musculares. Tal vehículo no se limita particularmente en la medida en que es farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos incluyen vehículos catiónicos tales como liposomas catiónicos, polímeros catiónicos, etc., o vehículos que usan envoltura viral. Los liposomas catiónicos son, por ejemplo, liposomas compuestos de 2-O(2-dietilaminoetil)carabamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y fosfolípidos como los constituyentes esenciales (de aquí en adelante denominado "liposoma A"), Oligofectamina (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), Lipofectina (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), Lipofectamina (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), Lipofectamina 2000 (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), DMRIE-C (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), GeneSilencer (marca registrada) (fabricada por Gene Therapy Systems), TransMessenger (marca registrada) (fabricada por QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (marca registrada) (fabricada por Mirus) y Nucleofector II (Lonza). Entre otros, se prefiere el liposoma A. Ejemplos de polímeros catiónicos son JetSI (marca registrada) (fabricada por Qbiogene, Inc.) y Jet-PEI (marca registrada) (polietilenimina, fabricada por Qbiogene, Inc.). Un ejemplo de vehículos que usan envolturas virales es GenomeOne (marca registrada) (liposoma HVJ-E, fabricado por Ishihara Sangyo). Alternativamente, los dispositivos médicos descritos en la patente japonesa núm. 2924179 y los vehículos catiónicos descritos en la Reedición nacional de Japón de las patentes del PCT núm. 2006/129594 y 2008/096690 también pueden usarse.

45 Para más detalles, la patente de los EE.UU. núm. 4.235.871, la patente de los EE.UU. núm. 4.737.323, la patente núm. WO96/14057, "New RRC, Liposomes: A practical approach, IRL Press, Oxford (1990) páginas 33-104", etc. puede referirse,

50 Una concentración del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención puede variar en dependencia del tipo de vehículo, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0,1 nM a 100 µM, preferentemente, en un intervalo de 100 nM a 10 µM. Una relación en peso del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención y el vehículo (vehículo/oligómero antisentido de la presente invención) puede variar en dependencia de la propiedad del oligómero, el tipo de vehículo, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0,1 a 100, preferentemente, en un intervalo de 0,1 a 10.

55 En adición al oligómero de la presente invención y el vehículo descrito anteriormente, los aditivos farmacéuticamente aceptables pueden formularse opcionalmente, además, en la composición de la presente invención. Ejemplos de tales aditivos son los adyuvantes de emulsificación (*por ejemplo*, ácidos grasos que tienen de 6 a 22 átomos de carbono y sus sales farmacéuticamente aceptables, albúmina y dextrano), estabilizadores (*por ejemplo*, colesterol y ácido fosfatídico), agentes isotonzantes (*por ejemplo*, cloruro de sodio, glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y agentes de control del pH (*por ejemplo*, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y trietanolamina). Pueden usarse uno o más de estos aditivos. El contenido del aditivo en la composición de la presente invención es apropiadamente del 90 % en peso o menos, preferentemente, del 70 % en peso o menos y con mayor preferencia, del 50 % en peso o menos.

65

La composición de la presente invención puede prepararse mediante la adición del oligómero de la presente invención a una dispersión del vehículo a y la agitación adecuada de la mezcla. Los aditivos pueden adicionarse en una etapa apropiada antes o después de la adición del oligómero de la presente invención. Un solvente acuoso que puede usarse para adicionar el oligómero de la presente invención no se limita particularmente en la medida en que es farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos son agua inyectable o agua destilada inyectable, fluido electrolítico tal como solución salina fisiológica, etc., tales como fluido de glucosa, fluido de maltosa, etc. Un experto en la materia puede elegir adecuadamente las condiciones de pH y temperatura para tal materia.

La composición de la presente invención puede prepararse en, *por ejemplo*, una forma líquida y su preparación liofilizada. La preparación liofilizada puede prepararse mediante la liofilización de la composición de la presente invención en una forma líquida de una manera convencional. La liofilización puede realizarse, por ejemplo, al esterilizar apropiadamente la composición de la presente invención en forma líquida, dispensar una alícuota en un contenedor de vial, realizar una congelación preliminar durante 2 horas en condiciones de aproximadamente -40 a -20 °C, realizar un secado primario de aproximadamente 0 a 10 °C bajo presión reducida, y luego realizar un secado secundario de aproximadamente 15 a 25 °C bajo presión reducida. En general, la preparación liofilizada de la composición de la presente invención puede obtenerse mediante el reemplazo del contenido del vial con gas nitrógeno y tapando.

La preparación liofilizada de la composición de la presente invención puede usarse en general después de la reconstitución mediante la adición de una solución adecuada opcional (líquido de reconstitución) y la redisolución de la preparación. Tal líquido de reconstitución incluye agua inyectable, solución salina fisiológica y otros fluidos de infusión. Un volumen del líquido de reconstitución puede variar en dependencia del uso previsto, etc., no se limita particularmente y es adecuadamente de 0,5 a 2 veces mayor que el volumen antes de la liofilización o no más de 500 mL.

Se desea controlar una dosis de la composición de la presente invención a ser administrada, al tener en cuenta los siguientes factores: el tipo y la forma de dosificación del oligómero de la presente invención contenida; condiciones de los pacientes que incluyen la edad, peso corporal, etc.; ruta de administración; y las características y extensión de la enfermedad. Una dosis diaria calculada como la cantidad del oligómero antisentido de la presente invención está generalmente en un intervalo de 0,1 mg a 10 g/humano y, preferentemente, de 1 mg a 1 g/humano. Este intervalo numérico puede variar ocasionalmente en dependencia del tipo de enfermedad objetivo, la vía de administración y la molécula objetivo. Por lo tanto, una dosis más baja que el intervalo puede ser suficiente en alguna ocasión y, a la inversa, una dosis más alta que el intervalo puede ser requerida ocasionalmente. La composición puede administrarse de una vez a varias veces al día o a intervalos de un día a varios días.

En otra modalidad más de la composición de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector capaz de expresar el oligonucleótido de la presente invención y el vehículo descrito anteriormente. Tal vector de expresión puede ser un vector capaz de expresar una pluralidad de los oligonucleótidos de la presente invención. La composición puede formularse con aditivos farmacéuticamente aceptables como en el caso de que la composición de la presente invención contenga el oligómero de la presente invención. Una concentración del vector de expresión contenida en la composición puede variar en dependencia del tipo de vehículo, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0,1 nM a 100 µM, preferentemente, en un intervalo de 100 nM a 10 µM. Una relación en peso del vector de expresión contenido en la composición y el vehículo (vehículo/vector de expresión) puede variar en dependencia de la propiedad del vector de expresión, el tipo de vehículo, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0,1 a 100, preferentemente, en un intervalo de 0,1 a 10. El contenido del vehículo contenido en la composición es el mismo que en el caso de que la composición de la presente invención contenga el oligómero de la presente invención, y un método para producir el mismo también es el mismo que en el caso de la composición de la presente invención.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los EJEMPLOS y a los EJEMPLOS DE PRUEBA a continuación, pero no se considera que se limite a estos.

50 EJEMPLOS

[Ejemplo de referencia 1]

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

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

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

el orden mencionado. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para dar 4,0 g del producto.

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

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

La cantidad de carga del producto se determinó a partir de la cantidad molar de tritilo por g de resina mediante la medición de la absorbancia de UV a 409 nm mediante el uso de un método conocido. La cantidad de carga de la resina era 192,2 $\mu\text{mol/g}$.

Condiciones de medición de UV

Aparato: U-2910 (Hitachi, Ltd.)
Solvente: ácido metanosulfónico
Longitud de onda: 265 nm
valor de ϵ : 45000

De acuerdo con las descripciones de los EJEMPLOS 1, 2 y el EJEMPLO DE REFERENCIA 1 a continuación, se sintetizaron los PMO mostrados por los PMO núm. 1-3 en la TABLA 1. El PMO sintetizado se disolvió en agua para inyección (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

[Tabla 1]

PMO núm.	Nota	La sec. con núm. de ident.:
1	extremo 5': grupo (3)	1
2	extremo 5': grupo (3)	2
3	Secuencia correspondiente a sec. con núm. de ident.:: 588 en el Documento de patente 3, extremo 5': grupo (3)	4

[Ejemplo 1]

PMO núm. 1

0,2 g de ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamida-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il] metoxi]-4-oxobutanoico soportado en una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de referencia 1) (26 μmol) se llenó en una columna con una punta de filtro. Después, el ciclo sintético que se muestra a continuación se inició con una máquina de síntesis de ácidos nucleicos (AKTA Oligopilot 10 plus). El compuesto de monómero de morfolino deseado se adicionó en cada ciclo de acoplamiento para dar la secuencia de nucleótidos del compuesto del título (consulte la Tabla 2 a continuación).

[Tabla 2]

Etapas	Reactivo	Volumen (mL)	Tiempo (minutos)
1	solución de desbloqueo	18-32	1.8-3.2
2	solución neutralizante y de lavado	30	1.5
3	solución de acoplamiento B	5	0.5
4	solución de acoplamiento A	1.3	0.25
5	reacción de acoplamiento por los reactivos que se adicionaron en las etapas 3 y 4		120-300
6	acetonitrilo	20	1.0
7	solución de tapado	9	2.0
8	acetonitrilo	30	2.0

La solución de desbloqueo usada fue una solución de diclorometano que contenía ácido trifluoroacético al 3 % (p/v). La solución neutralizadora y de lavado usada fue una solución que se obtuvo mediante la disolución de N,N-diisopropiletilamina en 10 % (v/v) y tetrahidrofurano en 5 % (v/v) en diclorometano que contenía 35 % (v/v) de acetonitrilo. La solución de acoplamiento A usada fue una solución que se obtuvo mediante la disolución del compuesto de monómero de morfolino en tetrahidrofurano hasta 0,10 M. La solución de acoplamiento B usada fue una solución que se obtuvo mediante la disolución de N,N-diisopropiletilamina hasta 20 % (v/v) y tetrahidrofurano hasta 10 % (v/v) en acetonitrilo. La solución de tapado usada fue una solución que se obtuvo mediante la disolución de 20 % (v/v) de anhídrido acético y 30 % (v/v) de 2,6-lutidina en acetonitrilo.

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

[Tabla 3]

Columna	XBridge 5 µm C18 (Waters, φ19×50 mm, 1 CV=14 mL)
Velocidad de flujo	10 mL/min
Temperatura de la columna	temperatura ambiente
Solución A	tampón TEAA 20 mM
Solución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 10→70 % /15 CV
CV: volumen de columna	

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

La solución acuosa resultante que contenía el producto objetivo se purificó mediante una columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones usadas son las que se muestran en la Tabla 4 a continuación.

[Tabla 4]

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

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

[Tabla 5]

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

El producto objetivo se recuperó y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en agua. La solución acuosa obtenida se liofilizó para dar el compuesto objetivo en forma de un sólido blanco similar al algodón.

ESI-TOF-MS	Clcd.: 10021,46
	Encontrada: 10021,91

[Ejemplo 2]

PMO núm. 2

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del

Ejemplo 1.

ESI-TOF-MS	Clcd.: 9916,71
	Encontrada: 9916,43

[Ejemplo comparativo 1]

PMO núm. 3

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del

Ejemplo 1.

ESI-TOF-MS	Clcd.: 9949,46
	Encontrada: 9949,41

[Ejemplo de prueba 1]

Ensayo in vitro

Los experimentos se realizaron mediante el uso de los oligómeros antisentido PMO núm. 1 y 2 de la presente invención y el oligómero antisentido PMO núm. 3. Las secuencias de diversos oligómeros antisentido se dan en la Tabla 6 a continuación.

[Tabla 6]

Secuencia de nucleótidos	PMO núm.
CGGTAAGTTCTGTCCTCAAGGAAGATGGCA	1
CTCATACCTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	2
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	3

Mediante el uso de un estuche Nucleofector L de la línea celular Amaxa en Nucleofector II (Lonza), se transfectaron 0,3, 1, 3, 10 μ M de los oligómeros PMO núm. 1 y 2 de la presente invención y el oligómero antisentido PMO núm. 3 con $3,5 \times 10^5$ de células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano). Se usó el Programa T-030.

Después de la transfección, las células se cultivaron durante tres días en 2 mL de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (fabricado por Sigma, de aquí en adelante el mismo) que contenía un 10 % de suero fetal de ternera (FCS) (fabricado por Invitrogen) en condiciones de 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se lavaron con PBS (fabricado por Nissui, de aquí en adelante el mismo) y se adicionaron 500 μ L de ISOGEN II (fabricado por Nippon Gene) a las células. Una vez que las células se dejaron reposar a temperatura ambiente durante unos minutos para lisar las células, el lisado se recogió en un tubo Eppendorf. El ARN total se extrajo de acuerdo con el protocolo adjunto a ISOGEN. La concentración del ARN total extraído se determinó mediante el uso de un NanoDrop ND-1000 (fabricado por LMS).

La RT-PCR en una sola etapa se realizó con 400 ng del ARN total extraído mediante el uso de un estuche Qiagen One Step RT-PCR Kit (fabricado por Qiagen). Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al estuche. Se usó un PTC-100 (fabricado por MJ Research) como termociclador. El programa de RT-PCR usado es el siguiente.

50 °C, 30 minutos: reacción de transcripción inversa

95 °C, 15 minutos: desnaturalización térmica.

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

72 °C, 10 minutos: extensión final.

Las secuencias de nucleótidos del iniciador directo y del iniciador inverso utilizadas para la RT-PCR se dan a continuación.

Iniciador directo: 5'- CTGAGTGGGAAGGCGGTAAAC-3' (sec. con núm. de ident.: 5)

Iniciador inverso: 5'- GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (sec. con núm. de ident.: 6)

El producto de reacción, 1 μ L de la RT-PCR anterior se analizó mediante el uso de un Bioanalyzer (fabricado por Agilent Technologies, Inc.). Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con omisión del exón 51 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin omisión del exón 51. Sobre la base de estos valores de medición de "A" y "B", se determinó la eficiencia de omisión mediante la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

Los resultados se muestran en la figura 1. Este experimento reveló que, los oligómeros antisentido de la presente invención podrían causar la omisión del exón 51 con una eficacia notablemente más alta que el oligómero antisentido PMO núm. 3.

[Ejemplo 3]

PMO núm. 4-6

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del EJEMPLO 1. Las secuencias de diversos oligómeros antisentido se dan a continuación.

Tabla 7

PMO número	Secuencia	ESI-TOF-MS		Nota	Sec. número ident.	con de
		PM	Encontrada			
4	AACATCAAGGAAGATGGCATT	7007.96	7007.97	extremo grupo (3)	5': 7	
5	TCCAACATCAAGGAAGATGGC	6968.97	6968.42	extremo grupo (3)	5': 8	
6	ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	6912.91	6912.85	extremo grupo (3)	5': 9	

[Ejemplo 4]

2'-O-metoxi-fosforotioatos mostrados por la sec. con número de identificación: de la 9 a la 33

Se produjeron varios oligómeros antisentido del título por subcontratación a Japan Bio Service Co. La secuencia de varios oligómeros antisentido se dan en la Tabla 8.

[Tabla 8]

Secuencia número	Secuencia	ESI-TOF-MS	
		PM	Encontrada
10	GAGUAAACAGUCUGAGUAGGAG	7453	7452.876
11	UGUGUCACCAGAGUAAACAGUC	7310	7313.793
12	AACCACAGGUUGUGUCACCAG	7309	7311.199
13	UUUCCUUAGUAACCACAGGUU	7209	7211.436
14	GAGAUGGCAGUUUCCUUAGUA	7328	7331.388
15	UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	7345	7347.440
16	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	7329	7329.982
17	AACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	7381	7381.059
18	AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	7316	7318.395
19	CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	7284	7286.932
20	CGGUUGAAAUCUGCCAGAGCA	7349	7351.895
21	UGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC	7286	7286.00
22	CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	7262	7262.929
23	GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	7350	7351.869
24	AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	7379	7378.383
25	UUAUAACUUGAUCAAGCAGAG	7319	7320.149
26	CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	7211	7212.295
27	CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	7144	7145.555
28	CAAGGUCACCCACCAUCACCC	7187	7187.709
29	UUGAUAUCCUCAAGGUCACCC	7207	7210.071
30	GAUCAUCUCGUUGAUAUCCUC	7185	71882.39
31	UCUGCUUGAUGAUCAUCUCGU	7202	7203.926
32	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	7346	7346.562
33	CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	7375	7375.678
34	CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	7317	7318.343

Aplicabilidad industrial

Los resultados experimentales en los EJEMPLOS DE PRUEBAS demuestran que los oligómeros de la presente invención provocaron la omisión del exón 51 con una eficacia marcadamente alta en las células RD. Por lo tanto, los oligómeros de la presente invención son extremadamente útiles para el tratamiento de la DMD.

Lista de secuencias

<110> NIPPON SHINYAKU CO., LTD. NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY

<120> ÁCIDO NUCLEICO ANTISENTIDO

<130> G1311WO

<150> JPA2014-48897

<151> 2014-03-12

<160> 34

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 1

cggttaagttc tgtctcaag gaagatggca 30

<210> 2

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 2

ctcatatctt ctgcttcaag gaagatggca 30

<210> 3

<211> 233

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

ctcctactca gactgttact ctggtgacac aacctgtggt tactaaggaa actgccatct 60

ccaaactaga aatgccatct tccttgatgt tggaggtacc tgctctggca gatttcaacc 120

gggcttggac agaacttacc gactggcttt ctctgcttga tcaagttata aaatcacaga 180

gggtgatggt ggggtgacctt gaggatatca acgagatgat catcaagcag aag 233

<210> 4

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 4

<400> 4
 ctccaacatc aaggaagatg gcatttctag 30

 5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 5
 ctgagtggaa ggcggtaaac 20
 15 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 6
 gaagtttcag ggccaagtca 20
 25 <210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 7
 aacatcaagg aagatggcat t 21
 35 <210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 8
 45 tccaacatca aggaagatgg c 21

 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 55 <400> 9
 acctccaaca tcaaggaaga t 21

 <210> 10
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 65 <400> 10

	gaguaacagu cugaguagga g	21
	<210> 11	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
10	<400> 11	
	ugugucacca gaguaacagu c	21
	<210> 12	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 12	
	aaccacaggu ugugucacca g	21
25	<210> 13	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
30	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 13	
	uuuccuuagu aaccacaggu u	21
35	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 14	
	gagauggcag uuuccuuagu a	21
45	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 15	
	uucuaguuug gagauggcag u	21
55	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 16	
65	aagauggcau uucuaguuug g	21

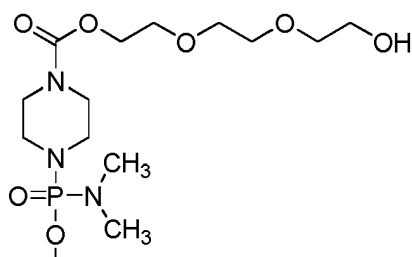
5 <210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 10 <400> 17
 aacaucaagg aagauggcau u 21
 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 20 <400> 18
 agguaccucc aacaucaagg a 21
 <210> 19
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 30 <400> 19
 cugccagagc agguaccucc a 21
 <210> 20
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 20
 cgguugaaau cugccagagc a 21
 45 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 21
 uguccaagcc cgguugaaau c 21
 55 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 22
 65 cgguaaguuc uguccaagcc c 21

5 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 10 <400> 23
 gaaagccagu cgguaguuc u 21
 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 20 <400> 24
 aucaagcaga gaaagccagu c 21
 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 30 <400> 25
 uuauaacuug aucaagcaga g 21
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 40 <400> 26
 cucugugauu uuauaacuug a 21
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 50 <400> 27
 caccaucacc cucugugauu u 21
 55 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 28
 65 caaggucacc caccaucacc c 21

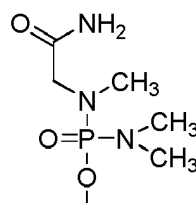
5 <210> 29
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 10 <400> 29
 uugauauccu caaggucacc c 21
 <210> 30
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 20 <400> 30
 gaucaucucg uugauauccu c 21
 <210> 31
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 30 <400> 31
 ucugcuugau gaucaucucg u 21
 <210> 32
 <211> 21
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 32
 ggcauuucua guuuggagau g 21
 45 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 33
 caaggaagau ggcauuucua g 21
 55 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 34
 65 ccuccaau caaggaagau g 21

Reivindicaciones

1. Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en de (a) a (c) a continuación, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este:
(a) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos de sec. con núm. de ident.: 1 o 2;
(b) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2, y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y
(c) el oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.
2. Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en de (e) a (g) a continuación, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este:
(e) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2;
(f) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 3 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2, y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y
(g) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.
3. Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste en (j) a continuación, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este:
(j) un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident.: 1 o 2 y tiene una actividad que provoca la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.
4. El oligómero antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, que es un oligonucleótido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.
5. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 4, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde se modifica el resto azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido.
6. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde el resto de azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo 2'-OH se reemplaza por uno seleccionado de entre el grupo que consta de OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br y I (en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquileo).
7. El oligómero antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 4 a la 6, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es cualquiera seleccionada del grupo que consiste en un enlace de fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace boranofosfato.
8. El oligómero antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, que es un oligómero de morfolino, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del este.
9. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 8, que es un oligómero de morfolino fosforodiamidato, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este.
10. El oligómero antisentido de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, en donde el extremo 5' es una cualquiera de las fórmulas químicas de la (1) a la (3) a continuación:



(1)



(2)



(3)

11. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como ingrediente activo el oligómero antisentido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10.
- 5 12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. El oligómero antisentido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, para usar en el tratamiento de la distrofia muscular.
- 10 14. El oligómero antisentido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el paciente con distrofia muscular en dicho tratamiento es un paciente con deleciones de nucleótidos dentro de los exones 29-50, 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 o 47-50.
- 15 15. El oligómero antisentido, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este para usar de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el paciente es un ser humano.

Figura 1

