

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 868**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 21/04** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.12.2012 PCT/JP2012/084295**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13100190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.12.2012 E 12861221 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 2799548**

54 Título: **Ácido nucleico antisentido**

30 Prioridad:

**28.12.2011 JP 2011288040**

**29.02.2012 JP 2012043092**

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

**18.03.2020**

73 Titular/es:

**NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (50.0%)**

**14, Kisshoin Nishinosho Monguchicho Minami-ku**

**Kyoto-shi**

**Kyoto 601-8550, JP y**

**NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND**

**PSYCHIATRY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WATANABE, NAOKI;**

**SEO, HARUNA;**

**TAKEDA, SHIN'ICHI y**

**NAGATA, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 748 868 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

**Campo técnico**

- 5 La presente invención se refiere a un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 55, 45, 50 o 44 en el gen de la distrofina humana, y una composición farmacéutica que comprende el oligómero.

**Antecedentes de la técnica**

10 La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más frecuente de distrofia muscular progresiva hereditaria que afecta a uno de cada 3500 niños recién nacidos. Aunque las funciones motoras rara vez son diferentes de las de los seres humanos sanos en la infancia y la niñez, se observa debilidad muscular en niños de alrededor de 4 a 5 años. Después, la debilidad muscular progresa a la pérdida de la deambulación a los aproximadamente 12 años y la muerte debido a insuficiencia cardíaca o respiratoria en la veintena. La DMD es un trastorno muy grave. En la actualidad, no existe una terapia efectiva para la DMD disponible, y se ha deseado desarrollar un nuevo agente terapéutico.

15 Se sabe que la DMD es causada por una mutación en el gen de la distrofina. El gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X y es un gen enorme que 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 ARNm en el que se unen 79 exones. Este ARNm se traduce en 3685 aminoácidos para producir la proteína distrofina. La proteína distrofina está asociada con el mantenimiento de la estabilidad de la membrana en las células musculares y es necesaria para que las células musculares sean menos frágiles. El gen de la distrofina de pacientes con DMD contiene una mutación y, por lo tanto, la proteína distrofina, que es funcional en las células musculares, rara vez se expresa. Por lo tanto, la estructura de las células musculares no se puede mantener en el cuerpo de los pacientes con DMD, lo que provoca una gran afluencia de iones de calcio en las células musculares. En consecuencia, se produce una respuesta similar a la inflamación para promover la fibrosis, de modo que las células musculares se pueden regenerar solo con dificultad.

25 La distrofia muscular de Becker (BMD, por sus siglas en inglés) también es causada por una mutación en el gen de la distrofina. Los síntomas involucran debilidad muscular acompañada de atrofia del músculo, pero generalmente 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 DMD y BMD residen en si el marco de lectura para los aminoácidos en la traducción del ARNm de distrofina en la proteína distrofina se ve alterado por la mutación o no (documento distinto de patente 1). Más específicamente, en DMD, la presencia de mutación cambia el marco de lectura de aminoácidos para que se elimine la expresión de la proteína distrofina funcional, mientras que en la BMD la proteína distrofina que funciona, aunque de manera imperfecta, se produce porque el marco de lectura de aminoácidos se conserva, mientras que una parte de los exones son eliminados por la mutación.

35 Se espera que la omisión del exón sirva como método para tratar la DMD. Este método implica modificar el corte y empalme para restaurar el marco de lectura de aminoácidos del ARNm de distrofina e inducir la expresión de la proteína de distrofina que tiene la función parcialmente restaurada (documento distinto de patente 2). La parte de la secuencia de aminoácidos, que es una diana 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 se mantiene el marco de lectura de aminoácidos, la función para estabilizar las células musculares se retiene parcialmente. En consecuencia, se espera que la omisión del exón conduzca a la DMD a síntomas similares a los de la BMD, que es más leve. El enfoque de omisión del exón ha pasado las pruebas con animales utilizando ratones o perros y ahora se evalúa actualmente en ensayos clínicos en pacientes con DMD humana.

45 La omisión de un exón puede ser inducida por unión de ácidos nucleicos antisentido que actúan selectivamente bien sobre un sitio cualquiera de corte y empalme 5' o 3' o ambos, o bien sobre sitios internos del exón. Un exón solo será incluido en el ARNm cuando ambos sitios de corte y empalme del mismo sean reconocidos por el espliceosoma, también llamado complejo de corte y empalme. Por lo tanto, se puede inducir la omisión del exón por acción selectiva de ácidos nucleicos antisentido sobre los sitios de corte y empalme. Además, la unión de una proteína SR a un potenciador de corte y empalme exónico (ESE, por sus siglas en inglés) se considera necesaria para que un exón sea reconocido por el mecanismo de corte y empalme. En consecuencia, la omisión del exón también puede ser inducida por acción selectiva de ESE.

50 Dado que una mutación del gen de la distrofina puede variar según los pacientes con DMD, los ácidos nucleicos antisentido se deben diseñar en función del sitio o tipo de mutación genética respectiva. En el pasado, Steve Wilton, et al., Universidad de Australia Occidental (documento distinto de patente 3) produjeron ácidos nucleicos antisentido que inducen la omisión del exón para los 79 exones, y los ácidos nucleicos antisentido que inducen la omisión del exón para 39 exones se produjeron por Annemieke Aartsma-Rus, et al., Países Bajos (documento distinto de patente 4).

55 Se considera que aproximadamente el 20% de todos los pacientes con DMD pueden ser tratados omitiendo los exones 55, 45, 50 y 44 (en adelante denominado "exón 55", "exón 45", "exón 50" y "exón 44", respectivamente). En los últimos años, varias organizaciones de investigación dieron a conocer los estudios en los que el exón 55, 45, 50 o 44 en el

gen de la distrofina se seleccionaron para la omisión del exón (documentos de patente 1 a 8). Sin embargo, todavía no se ha establecido una técnica para omitir el exón 55, 45, 50 o 44 con una alta eficacia.

5 El documento WO 2010/048586 A1 describe una composición para utilizar en la producción de omisión del exón 44, 45, 50 o 55 en el procesamiento de ARNm preprocesado de distrofina humana, que comprende un compuesto antisentido sustancialmente sin carga que contiene 20-35 subunidades de morfolino unidas por fósforo.

El documento WO 2010/123369 A1 describe un oligonucleótido que comprende una inosina y/o un nucleótido que contiene una base que puede formar un par de bases oscilantes o un equivalente funcional del mismo.

10 A. Aartsma-Rus et al. (Molecular Therapy, vol. 14, nº. 3, 1 de septiembre de 2006, páginas 401-407) describe la omisión terapéutica de exón para la DMD por acción selectiva doble dentro de uno o múltiples exones.

C. Beroud et al. (Human Mutation, vol. 28, nº. 2, 1 de febrero de 2007, páginas 196-202) describe que la omisión de multiexones que conduce a una proteína de DMD artificial que carece de aminoácidos de los exones 45 a 55 podría rescatar hasta el 63% de los pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

15 S.D. Wilton et al. (Molecular Therapy, vol. 15, nº. 7, 1 de julio de 2007, páginas 1288-1296) describe la omisión del exón inducida por oligonucleótidos antisentido a través de la transcripción del gen de la distrofina humana.

El documento WO2010/050801 A1 describe una molécula que se une a un tramo continuo de al menos 21 nucleótidos dentro del exón 45 del pre-ARNm de DMD.

El documento de patente de EE.UU. 2010/168212 A1 describe moléculas que pueden ser capaces de provocar la omisión del exón en el gen de la distrofina.

20 El documento WO 2009/054725 A2 describe un método para aliviar uno o más síntomas de DMD o BMD en un individuo que utiliza un compuesto complementario para reducir la inflamación del tejido muscular, y/o un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de la fibra muscular.

25 El documento WO 2010/050802 A2 describe un método en donde se utiliza una molécula con la intención de inducir y/o promover la omisión de al menos uno de los exones 43, exón 46, exones 50-53 del pre-ARNm de DMD en un paciente.

Moulton H.M. y Moulton J.D (Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1798, nº. 12, 1 de diciembre de 2010, páginas 2296-2303) describe los morfolinos y sus conjugados peptídicos para el tratamiento de DMD.

Qi-Long Lu et al. (Molecular Therapy, vol. 19, no. 1, 1 de enero de 2011, páginas 9-15) describe el estado de la omisión de exones como un enfoque terapéutico para la DMD.

30 El documento WO 2011/057350 A1 describe una molécula antisentido capaz de unirse a un sitio selectivo seleccionado para inducir la omisión del exón en el gen de la distrofina.

El documento de patente de EE.UU. 7807816 A1 describe un oligonucleótido antisentido aislado de 30 a 50 nucleótidos de longitud que comprende una cierta secuencia de nucleótidos, en donde en la secuencia las bases de uracilo son opcionalmente bases de timina.

35 El documento EP 1568769 A1 describe productos farmacéuticos de ácido nucleico ENA capaces de modificar el corte y empalme de precursores de ARNm, más específicamente, compuestos oligonucleotídicos antisentido para secuencias potenciadoras de corte y empalme dentro del exón 19, 41, 45, 46, 44, 50, 55, 51 o 53 del gen de la distrofina, así como agentes terapéuticos para la distrofia muscular que comprende los compuestos.

Documento de patente 1: Publicación internacional del documento WO 2006/000057

40 Documento de patente 2: Publicación internacional del documento WO 2004/048570

Documento de patente 3: Publicación de solicitud de patente no examinada de EE.UU. 2010/0168212

Documento de patente 4: Publicación internacional del documento WO2010/048586

Documento de patente 5: Publicación internacional del documento WO 2004/083446

Documento de patente 6: Publicación internacional del documento WO 2010/050801

45 Documento de Patente 7: Publicación internacional del documento WO 2009/139630

Documento de Patente 8: Publicación internacional del documento WO 2010/048586 A1

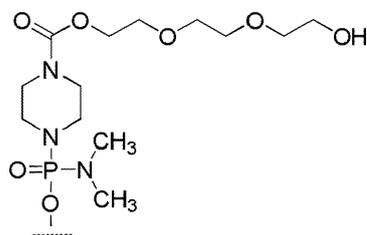
Documento de Patente 9: Publicación internacional de documento WO 2010/123369 A1

- Documento de patente 10: Publicación internacional del documento WO2010/050801 A1
- Documento de patente 11: Publicación de solicitud de patente no examinada de EE.UU. 2010/168212 A1
- Documento de patente 12: Publicación internacional del documento WO 2009/054725 A2
- 5 Documento de Patente 13: Publicación internacional del documento WO 2010/050802 A2
- Documento de patente 14: Publicación internacional del documento WO 2011/057350 A1
- Documento de Patente 15: Publicación de patente de EE.UU. 7807816 A1
- Documento de Patente 16: Publicación de solicitud de patente europea EP 1568769 A1
- Documento distinto de patente 1: Monaco A.P. et al., Genomics 1988; 2: p.90-95
- 10 Documento distinto de patente 2: Matsuo M., Brain Dev 1996; 18: p. 167-172
- Documento distinto de patente 3: Wilton S.D., et al., Molecular Therapy 2007: 15: p.1288-96
- Documento distinto de patente 4: Annemieke Aartsma-Rus et al. (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77
- Documento distinto de patente 5: Linda J. Popplewell et al., (2010) Neuromuscular Disorders, vol. 20, nº. 2, p. 102-10
- Documento distinto de patente 6: A. Aartsma-Rus et al., Molecular Therapy, vol. 14, nº. 3, 1 de septiembre de 2006, páginas 401-407
- 15 Documento distinto de patente 7: C. Beroud et al., Human Mutation, vol. 28, nº. 2, 1 de febrero de 2007, páginas 196-202
- Documento distinto de patente 8: S.D. Wilton et al., Molecular Therapy, vol. 15, nº. 7, 1 de julio de 2007, páginas 1288-1296
- 20 Documento distinto de patente 9: Moulton H.M. y Moulton J.D, Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1798, nº. 12, 1 de diciembre de 2010, páginas 2296-2303
- Documento distinto de patente 10: Qi-Long Lu et al., Molecular Therapy, vol. 19, nº. 1, 1 de enero de 2011, páginas 9-15

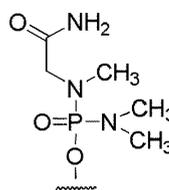
### Descripción de la invención

- 25 En las circunstancias anteriores, se han deseado oligómeros antisentido que inducen fuertemente la omisión del exón 55, el exón 45, el exón 50 o el exón 44 en el gen de la distrofina y las terapias de distrofia muscular que comprenden oligómeros de los mismos.
- Como resultado de estudios detallados de la estructura del gen de la distrofina, los presentes autores han descubierto que la omisión del exón 55 puede ser inducida con una alta eficacia por oligómeros antisentido que seleccionan la
- 30 secuencia que consiste de alrededor de los nucleótidos 14° al 34° o del 15° al 34° del extremo 5' del exón 55 en el precursor de ARNm (de aquí en adelante denominado "pre-ARNm") en el gen de la distrofina con oligómeros antisentido.
- Los presentes autores también han encontrado que la omisión del exón 45 puede ser inducida con una alta eficacia por oligómeros antisentido que seleccionan la secuencia que consiste de alrededor de los nucleótidos 1° al 25° y del
- 35 6° al 30° desde el extremo 5' del exón 45 en el pre-ARNm en el gen de la distrofina con oligómeros antisentido.
- Además, los presentes autores han encontrado que la omisión del exón 50 puede ser inducida con una alta eficacia por oligómeros antisentido que seleccionan la secuencia que consiste de alrededor de los nucleótidos 107° al 127° desde el extremo 5' del exón 50 en el pre-ARNm en el gen de la distrofina con oligómeros antisentido.
- 40 Además, los presentes autores también han encontrado que la omisión del exón 44 puede ser inducida con una alta eficacia por oligómeros antisentido que seleccionan la secuencia que consiste de alrededor de los nucleótidos 11° al 32° y del 26° al 47° desde el extremo 5' del exón 44 en el pre-ARNm en el gen de la distrofina con oligómeros antisentido.
- En base a este hallazgo, los presentes autores han logrado la presente invención.
- Es decir, la presente invención es como sigue.

- [1] Un oligómero antisentido que causa la omisión del exón 55° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 14° al 34° o 15° al 34°, desde el extremo 5' del exón 55° en el gen de la distrofina humana.
- 5 [2] El oligómero antisentido del párrafo [1], que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 157° al 177° y 157° al 176° de la SEQ ID NO: 5.
- [3] Un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 45° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 1° al 21°, desde el extremo 5' del exón 45° en el gen de la distrofina humana.
- 10 [4] El oligómero antisentido del párrafo [3], que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 156° al 176° de la SEQ ID NO: 6.
- [5] Un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 50° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 107° al 127°, desde el extremo 5' del exón 50° en el gen de la distrofina humana.
- 15 [6] El oligómero antisentido del párrafo [5], que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 3° al 23° de la SEQ ID NO: 7.
- [7] Un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 44° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 27° al 47° o 27° al 46°, desde el extremo 5' del exón 44° en el gen de la distrofina humana.
- 20 [8] El oligómero antisentido del párrafo [7], que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 102° al 122° y 103° al 122° de la SEQ ID NO: 8.
- [9] El oligómero antisentido según uno cualquiera de los párrafos [1] a [8], que es un oligonucleótido.
- [10] El oligómero antisentido según el párrafo [9], en donde está modificado el resto de azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido.
- 25 [11] El oligómero antisentido según el párrafo [10], 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 está reemplazado por uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br e I (en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquileo).
- 30 [12] El oligómero antisentido según el párrafo [10] u [11], en donde la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace boranofosfato.
- [13] El oligómero antisentido según uno cualquiera de los párrafos [1] a [8], que es un oligómero de morfolino.
- [14] El oligómero antisentido según el párrafo [13], que es un oligómero de morfolino fosforodiamidato.
- 35 [15] El oligómero antisentido según el párrafo [13] o [14], en donde el extremo 5' es cualquiera de los grupos de fórmulas químicas (1) a (3) a continuación:



(1)



(2)



(3)

- [16] Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como ingrediente activo el oligómero antisentido según uno cualquiera de los párrafos [1] a [15], o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 40 El oligómero antisentido de la presente invención puede inducir la omisión del exón 55, el exón 45, el exón 50 o el exón 44 en el gen de la distrofina humana con altas eficiencias. Además, los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne se pueden aliviar eficazmente administrando la composición farmacéutica de la presente invención. Además, dado que el oligómero antisentido de la presente invención selecciona solo a secuencias de exón en

pacientes, las secuencias diana se conservan entre los individuos en comparación con los casos con esas secuencias diana en intrones. Por lo tanto, el oligómero antisentido de la presente invención es capaz de lograr eficiencias de omisión excelentes independientemente de las variedades individuales (diferencias personales). Además, el oligómero antisentido de la presente invención tiene una longitud corta de 20 pb o alrededor y tiene menos probabilidad de contener mutaciones originadas de variedades individuales (interpersonalidad), p. ej. SNP, por sus siglas en inglés (polimorfismo de un solo nucleótido) en las secuencias diana en comparación con los oligómeros antisentido convencionales para el tratamiento de DMD que tienen longitudes de aproximadamente 25 pb. Esta característica también ayuda al oligómero antisentido de la presente invención a lograr eficiencias de omisión excelentes independientemente de la variedad individual (diferencias personales). Además, el oligómero antisentido de la presente invención tiene menos efectos secundarios provocados por la inducción de citocinas, etc., ya que los oligómeros antisentido que tienen cadenas más cortas tienen menos tendencia a inducir inmunidad en general.

Además, dado que el oligómero antisentido de la presente invención es bastante corto, el coste de fabricación es relativamente pequeño.

### 15 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 muestra la eficacia de omisión del exón 45 por el oligómero de 2'-OMe-S-ARN en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 2 muestra la eficacia de omisión del exón 45 por el oligómero de 2'-OMe-S-ARN en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

20 FIG. 3 muestra la eficacia de omisión del exón 45 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 4 muestra la eficacia de omisión del exón 45 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

25 FIG. 5 muestra la eficacia de omisión del exón 45 por PMO en el gen de la distrofina humana en las células donde se induce el gen MyoD humano en fibroblastos de un paciente DMD humano (células GM05017) para inducir la diferenciación en células musculares.

FIG. 6 muestra la eficacia de omisión del exón 55 por el oligómero de 2'-OMe-S-ARN en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

30 FIG. 7 muestra la eficacia de omisión del exón 55 por el oligómero de 2'-OMe-S-ARN en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 8 muestra la eficacia de omisión del exón 55 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 9 muestra la eficacia de omisión del exón 44 por el oligómero de 2'-OMe-S-ARN en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

35 FIG. 10 muestra la eficacia de omisión del exón 44 por el oligómero de 2'-OMe-S-ARN en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 11 muestra la eficacia de omisión del exón 44 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

40 FIG. 12 muestra la eficacia de omisión del exón 44 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 13 muestra la eficacia de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 14 muestra la eficacia de omisión del exón 45 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

45 FIG. 15 muestra la eficacia de omisión del exón 45 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 16 muestra la eficacia de omisión del exón 55 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

50 FIG. 17 muestra la eficacia de omisión del exón 55 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomioma humano (células RD).

FIG. 18 muestra la eficacia de omisión del exón 44 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomiosarcoma humano (células RD).

5 FIG. 19 muestra la eficacia de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rhabdomiosarcoma humano (células RD).

FIG. 20 muestra la eficacia de omisión del exón 44 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 45 (células GM05112).

FIG. 21 muestra el efecto (Western Blotting) de omisión del exón 44 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 45 (células GM05112).

10 FIG. 22 muestra el efecto (RT-PCR) de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 45 (células GM05112).

FIG. 23 muestra la eficacia de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 45 (células GM05112).

15 FIG. 24 muestra el efecto (RT-PCR) de omisión del exón 55 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 45 (células GM05112).

FIG. 25 muestra la eficacia de omisión del exón 55 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 45 (células GM05112).

FIG. 26 muestra el efecto (RT-PCR) de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de pacientes con DMD humana con duplicación de los exones 8-9 (células 11-0627).

20 FIG. 27 muestra la eficacia de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con duplicación de los exones 8-9 (células 11-0627).

FIG. 28 muestra el efecto (RT-PCR) de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección de los exones 51-55 (células GM04364).

25 FIG. 29 muestra la eficacia de omisión del exón 50 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección de los exones 51-55 (células GM04364).

FIG. 30 muestra el efecto (RT-PCR) de omisión del exón 55 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 54 (células 04-035).

FIG. 31 muestra la eficacia de omisión del exón 55 por PMO en el gen de la distrofina humana en los fibroblastos de un paciente con DMD humana con delección del exón 54 (células 04-035).

30 Mejor modo para realizar la invención

De aquí en adelante, la presente invención se describe en detalle. Las realizaciones descritas a continuación están destinadas a presentarse a modo de ejemplo simplemente para describir la invención, pero no se limitan solo a las siguientes realizaciones.

35 De aquí en adelante, la presente invención se describe en detalle. Las realizaciones descritas a continuación están destinadas a presentarse a modo de ejemplo simplemente para describir la invención, pero no se limitan solo a las siguientes realizaciones.

Sin una descripción en particular, la secuencia de aminoácidos representa el amino terminal como izquierdo y el carboxilo terminal como derecho, y la secuencia base representa el extremo 5' como izquierdo y el extremo 3' como derecho.

40 1. Oligómero antisentido

La presente invención proporciona el oligómero antisentido (de aquí en adelante denominado "oligómero de omisión del exón 55 de la presente invención") que provoca la omisión del exón 55 en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (de aquí en adelante también denominada "secuencia diana del exón 55") que consiste en los nucleótidos 14° al 34°, o 15° al 34°, del extremo 5' del exón 55 en el gen de la distrofina humana.

45 La presente invención también proporciona el oligómero antisentido (de aquí en adelante denominado "oligómero de omisión del exón 45 de la presente invención") que provoca la omisión del exón 45 en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (de aquí en adelante, también denominada "secuencia diana del exón 45") que consiste en los nucleótidos 1° al 21°, desde el extremo 5' del exón 45 en el gen de la distrofina humana.

Además, la presente invención proporciona el oligómero antisentido (de aquí en adelante denominado "oligómero de omisión del exón 50 de la presente invención") que provoca la omisión del exón 50 en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (de aquí en adelante, también denominadas "secuencia diana del exón 50") que consisten en los nucleótidos 107° al 127°, desde el extremo 5' del exón 50 en el gen de la distrofina humana.

Además, la presente invención proporciona el oligómero antisentido (de aquí en adelante denominado "oligómero de omisión del exón 44 de la presente invención") que provoca la omisión del exón 44 en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos (de aquí en adelante, también denominadas "secuencia diana del exón 44") que consisten en los nucleótidos 27° al 46°, o 27° al 47, desde el extremo 5' del exón 44 en el gen de la distrofina humana.

De aquí en adelante, los oligómeros de omisión del exón 55, 45, 50 y 44 se pueden denominar colectivamente como los "oligómeros de la presente invención".

Exón 55, 45, 50 y 44 en el gen de la distrofina humana

En la presente invención, el término "gen" pretende significar un gen genómico y también incluye ADNc, precursor de ARNm y ARNm. Preferiblemente, el gen es 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 3.0 Mbp 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, distribuidas como 79 exones en todo el gen de la distrofina humana (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). El pre-ARNm, que es la transcripción del gen de la distrofina humana, se corta y empalma para generar ARNm maduro de 14 kb. Se conoce la secuencia de nucleótidos del gen de la distrofina de tipo salvaje humano (N° de acceso GenBank NM\_004006).

La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 2° al 190°, desde el extremo 5' del exón 55 en el gen de la distrofina humana de tipo salvaje está representada por la SEQ ID NO: 1. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 176°, desde el extremo 5' del exón 45 en el gen de la distrofina humana de tipo salvaje está representada por la SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 109°, desde el extremo 5' del exón 50 y los nucleótidos 1° al 20°, desde el extremo 5' del intrón 50 en el gen de la distrofina humana de tipo salvaje está representada por la SEQ ID NO : 3.

La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 148°, desde el extremo 5' del exón 44 en el gen de la distrofina humana de tipo salvaje está representada por la SEQ ID NO: 4.

El oligómero de la presente invención está diseñado para provocar la omisión del exón 55, 45, 50 o 44 en el gen de la distrofina humana, modificando así la proteína codificada por el tipo DMD del gen de la distrofina en el tipo BMD de la proteína de la distrofina. En consecuencia, los exones 55, 45, 50 y 44 en el gen de la distrofina que son las dianas de la omisión del exón por el oligómero de la presente invención incluyen los tipos tanto salvajes como mutantes.

Específicamente, los mutantes del exón 55, 45, 50 y 44 del gen de la distrofina humana son los polinucleótidos definidos en (a) o (b) a continuación.

(a) Un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 192° de la SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 2 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 4° al 179° de la SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 109° de la SEQ ID NO : 3), o SEQ ID NO: 4;

(b) Un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90% de homología con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 192° de la SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 2 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 4° al 179° de la SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 109° de SEQ ID NO: 3), o SEQ ID NO: 4.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "polinucleótido" pretende significar ADN o ARN.

Como se utiliza en la presente memoria, el término "polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas" se refiere, por ejemplo, a un polinucleótido obtenido por hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación Southern o similar, utilizando como sonda todo o parte de un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 192° de la SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 2 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 4° al 179° de la SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 109 de la SEQ ID NO: 3), o SEQ ID NO: 4. El método de hibridación que se puede utilizar 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.

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

15 Como se utiliza en la presente memoria, el término "condiciones rigurosas" puede ser cualquiera de las condiciones de baja rigurosidad, condiciones de moderada rigurosidad o condiciones de alta rigurosidad. El término "condición de baja rigurosidad" es, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución de Denhardt, 0.5% de SDS, 50% de formamida a una temperatura de 32°C. El término "condición de moderada rigurosidad" es, por ejemplo, 5x SSC, 5x solución de Denhardt, 0.5% de SDS, 50% de formamida a una temperatura de 42°C, o 5x SSC, 1% de SDS, Tris-HCl (pH 7.5) 50mM, 50% de formamida a una temperatura de 42°C. El término "condición de alta rigurosidad" es, por ejemplo, 5x 20 SSC, 5x solución de Denhardt, 0.5% de SDS, 50% de formamida a una temperatura de 50°C o 0,2x SSC, 0,1% de SDS a una temperatura de 65°C. En estas condiciones, se espera que los polinucleótidos con mayor homología se obtengan eficientemente a temperaturas más altas, aunque están involucrados múltiples factores en la rigurosidad de la hibridación, que incluye la temperatura, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, la fuerza iónica, el tiempo, la concentración de sal y otros, y los expertos en la técnica pueden seleccionar aproximadamente estos 25 factores para lograr una rigurosidad similar.

Cuando se utilizan kits disponibles comercialmente para la hibridación, por ejemplo, se puede utilizar un sistema Alkphos de marcaje y detección directo (GE Healthcare). En este caso, según el protocolo adjunto, después del cultivo con una sonda marcada durante la noche, la membrana se lava con un tampón de lavado primario que contiene 0.1% de SDS (p/v) a una temperatura de 55°C, detectando así los polinucleótidos hibridados. Alternativamente, cuando la sonda se marca con digoxigenina (DIG) utilizando un reactivo disponible comercialmente (p. ej., una mezcla de marcaje de PCR (Roche Diagnostics), etc.) para producir una sonda basada en toda o parte de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 192° de la SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 2 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 4° al 179° de la SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los 35 nucleótidos 1° al 109° de la SEQ ID NO: 3), o SEQ ID NO: 4, la hibridación se puede detectar con un kit de detección de ácido nucleico DIG (Roche Diagnostics).

Además de los polinucleótidos descritos anteriormente, otros polinucleótidos que se pueden hibridar incluyen polinucleótidos que tienen 90% o superior, 91% o superior, 92% o superior, 93% o superior, 94% o superior, 95% o superior, 96% o superior, 97% o superior, 98% o superior, 99% o superior, 99.1% o superior, 99.2% o superior, 99.3% o superior, 99.4% o superior, 99.5% o superior, 99.6% o superior, 99.7% o superior, 99.8% o superior, 99.9% o superior 40 identidad con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 192° de la SEQ ID NO: 1), SEQ ID NO: 2 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 4° al 179° de la SEQ ID NO: 2), SEQ ID NO: 3 (o una secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 109° de la SEQ ID NO: 3), o SEQ ID NO: 4, según lo calculado por el software de búsqueda de homología BLAST utilizando los parámetros predeterminados. 45

La identidad entre las secuencias de nucleótidos se puede determinar utilizando el algoritmo BLAST, por sus siglas en inglés (herramienta de búsqueda de alineación local básica) por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Se han desarrollado programas llamados BLASTN y BLASTX basados en el algoritmo BLAST (Altschul SF, et al.: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Cuando se secuencia una 50 secuencia de nucleótidos utilizando BLASTN, los parámetros son, por ejemplo, puntaje=100 y longitud de palabra=12. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se emplean los parámetros predeterminados para cada programa.

La secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 2° al 190° desde el extremo 5' del exón 55 está representada por la SEQ ID NO: 5. En la presente memoria, la secuencia de nucleótidos 55 que consiste en los nucleótidos 2° al 1°, desde el extremo 5' del exón 55 (la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 2° de la SEQ ID NO: 1) representa la secuencia de nucleótidos que consiste en 2 nucleótidos como máximo en el extremo 3' secuencia abajo del intrón 54 que se encuentra entre el exón 54 y el exón 55. Más específicamente, la secuencia de nucleótidos del exón 55 es una que consiste en los nucleótidos 3° al 192° de la SEQ ID NO: 1 y la secuencia complementaria al exón 55 es una que consiste en los nucleótidos 1° al 190° de la SEQ ID 60 NO: 5.

5 En la presente memoria, la secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 14° al 34°, o del 15° al 34°, desde el extremo 5' del exón 55° en el gen de la distrofina humana es respectivamente idéntica a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 157° al 177°, o del 157° al 176° de la SEQ ID NO: 5.

10 La secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 176°, desde el extremo 5' del exón 45 está representada por la SEQ ID NO: 6. En la presente memoria, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 1°, desde el extremo 5' del exón 45 (la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 3° de la SEQ ID NO: 2) representa la secuencia de nucleótidos que consiste en 3 nucleótidos como máximo en el extremo 3' secuencia abajo del intrón 44 que se encuentra entre el exón 44 y el exón 45. Más específicamente, la secuencia de nucleótidos del exón 45 es la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 4° al 179° de la SEQ ID NO: 2 y la secuencia complementaria al exón 45 es la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 176° de la SEQ ID NO: 6.

15 En la presente memoria, la secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 1° al 21°, desde el extremo 5' del exón 45° en el gen de la distrofina humana es, respectivamente, idéntica a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 156° a 176° de la SEQ ID NO: 6.

20 La secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 109°, desde el extremo 5' del exón 50, y los nucleótidos 1° al 20°, desde el extremo 5' del intrón 50, está representada por la SEQ ID NO: 7. En la presente memoria, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 20°, desde el extremo 5' del intrón 50 (la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 110° al 129° de la SEQ ID NO: 3) es la secuencia de nucleótidos que consiste en 20 nucleótidos como máximo en el extremo 5' secuencia arriba del intrón 50 que se encuentra entre el exón 50 y el exón 51. Más específicamente, la secuencia de nucleótidos del exón 50 es la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 109° de la SEQ ID NO: 3 y la secuencia complementaria al exón 50 es la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 21° al 129° de la SEQ ID NO: 7.

En la presente memoria, la secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 107° al 127°, desde el extremo 5' del exón 50° en el gen de la distrofina humana es respectivamente idéntica a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 3° al 23° de la SEQ ID NO: 7.

30 La secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 1° al 148, desde el extremo 5' del exón 44 está representada por la SEQ ID NO: 8.

En la presente memoria, la secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 27° al 46°, o 27° al 47°, desde el extremo 5' del exón 44° en el gen de la distrofina humana es respectivamente idéntica a la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos 103° al 122°, o el 102° al 122° de la SEQ ID NO: 8.

35 La relación entre la localización en la secuencia de nucleótidos desde el extremo 5' del exón 55°, 45°, 50° y 44° y la localización en la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 5-8 se representa en las tablas siguientes

Tabla 1

La localización de los nucleótidos del extremo 5' de las secuencias de nucleótidos del exón 55	la localización de los nucleótidos correspondientes en las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO.5
-2°~19°	172°~192°
-2°~20°	171°~192°
-2°~21°	170°~192°
-2°~22°	169°~192°
-2°~23°	168°~192°
-1°~19°	172°~191°
-1°~20°	171°~191°
-1°~21°	170°~191°
-1°~22°	169°~191°
-1°~23°	168°~191°
1°~19°	172°~190°
1°~20°	171°~190°

# ES 2 748 868 T3

1°~21°	170°~190°
1°~22°	169°~190°
1°~23°	168°~190°
2°~19°	172°~189°
2°~20°	171°~189°
2°~21°	170°~189°
2°~22°	169°~189°
2°~23°	168°~189°
3°~19°	172°~188°
3°~20°	171°~188°
3°~21°	170°~188°
3°~22°	169°~188°
3°~23°	168°~188°
9°~29°	162°~182°
9°~30°	161°~182°
9°~31°	160°~182°
9°~32°	159°~182°
9°~33°	158°~182°
10°~29°	162°~181°
10°~30°	161°~181°
10°~31°	160°~181°
10°~32°	159°~181°
10°~33°	158°~181°
11°~29°	162°~180°
11°~30°	161°~180°
11°~31°	160°~180°
11°~32°	159°~180°
11°~33°	158°~180°
12°~29°	162°~179°
12°~30°	161°~179°
12°~31°	160°~179°
12°~32°	159°~179°
12°~33°	158°~179°
13°~29°	162°~178°
13°~30°	161°~178°
13°~31°	160°~178°
13°~32°	159°~178°
13°~33°	158°~178°
12°~34°	157°~179°
12°~35°	156°~179°
12°~36°	155°~179°

ES 2 748 868 T3

13°~34°	157°~178°
13°~35°	156°~178h
13°~36°	155°~178°
14°~32°	159°~177°
14°~33°	158°~177°
14°~34°	157°~177°
14°~35°	156°~177°
14°~36°	155°~177°
15°~32°	159°~176°
15°~33°	158°~176°
15°~34°	157°~176°
15°~35°	156°~176°
15°~36°	155°~176°
16°~32°	159°~175°
16°~33°	158°~175°
16°~34°	157°~175°
16°~35°	156°~175°
16°~36°	155°~175°

Tabla 2

la localización de nucleótidos del extremo 5' de las secuencias de nucleótidos del exón 45	la localización de los nucleótidos correspondientes en las secuencias de nucleótidos en la SEQ ID NO.6
-3°~19°	158°~179°
-3°~20°	157°~179°
-3°~21°	156°~179°
-3°~22°	155°~179°
-3°~23°	154°~179°
-2°~19°	158°~178°
-2°~20°	157°~178°
-2°~21°	156°~178°
-2°~22°	155°~178°
-2°~23°	154°~178°
-1°~19°	158°~177°
-1°~20°	157°~177°
-1°~21°	156°~177°
-1°~22°	155°~177°
-1°~23°	154°~177°
1°~19°	158°~176°
1°~20°	157°~176°
1°~21°	156°~176°
1°~22°	155°~176°

ES 2 748 868 T3

1°~23°	154°~176°
2°~19°	158°~175°
2°~20°	157°~175°
2°~21°	156°~175°
2°~22°	155°~175°
2°~23°	154°~175°
-2°~24°	153°~178°
-2°~25°	152°~178°
-2°~26°	151°~178°
-2°~27°	150°~178°
-1°~24°	153°~177°
-1°~25°	152°~177°
-1°~26°	151°~177°
-1°~27°	150°~177°
1°~24°	153°~176°
1°~25°	152°~176°
1°~26°	151°~176°
1°~27°	150°~176°
2°~24°	153°~175°
2°~25°	152°~175°
2°~26°	151°~175°
2°~27°	150°~175°
3°~23°	154°~174°
3°~24°	153°~174°
3°~25°	152°~174°
3°~26°	151°~174°
3°~27°	150°~174°
4°~28°	149°~173°
4°~29°	148°~173°
4°~30°	147°~173°
4°~31°	146°~173°
4°~32°	147°~173°
5°~28°	149°~172°
5°~29°	148°~172°
5°~30°	147°~172°
5°~31°	146°~172°
5°~32°	145°~172°
6°~28°	149°~171°
6°~29°	148°~171°
6°~30°	147°~171°
6°~31°	146°~171°

ES 2 748 868 T3

6°~32°	145°~171°
7°~28°	149°~170°
7°~29°	148°~170°
7°~30°	147°~170°
7°~31°	146°~170°
7°~32°	145°~170°
8°~28°	149°~169°
8°~29°	148°~169°
8°~30°	147°~169°
8°~31°	146°~169°
8°~32°	145°~169°

Tabla 3

la localización de nucleótidos del extremo 5' de las secuencias de nucleótidos del exón 50	la localización de los nucleótidos correspondientes en las secuencias de nucleótidos en la SEQ ID NO.7
105°~125°	5°~25°
105°~126°	4°~25°
105°~127°	3°~25°
105°~128°	2°~25°
105°~129°	1°~25°
106°~125°	5°~24°
106°~126°	4°~24°
106°~127°	3°~24°
106°~128°	2°~24°
106°~129°	1°~24°
107°~125°	5°~23°
107°~126°	4°~23°
107°~127°	3°~23°
107°~128°	2°~23°
107°~129°	1°~23°
108°~125°	5°~22°
108°~126°	4°~22°
108°~127°	3°~22°
108°~128°	2°~22°
108°~129°	1°~22°
109°~125°	5°~21°
109°~126°	4°~21°
109°~127°	3°~21°
109°~128°	2°~21°
109°~129°	1°~21°

Tabla 4

la localización de nucleótidos del extremo 5' de las secuencias de nucleótidos del exón 44	la localización de los nucleótidos correspondientes en las secuencias de nucleótidos en la SEQ ID NO.8
9°~30°	119°~140°
9°~31°	118°~140°
9°~32°	117°~140°
9°~33°	116°~140°
9°~34°	115°~140°
10°~30°	119°~139°
10°~31°	118°~139°
10°~32°	117°~139°
10°~33°	116°~139°
10°~34°	115°~139°
11°~30°	119°~138°
11°~31°	118°~138°
11°~32°	117°~138°
11°~33°	116°~138°
11°~34°	115°~138°
12°~30°	119°~137°
12°~31°	118°~137°
12°~32°	117°~137°
12°~33°	116°~137°
12°~34°	115°~137°
13°~30°	119°~136°
13°~31°	118°~136°
13°~32°	117°~136°
13°~33°	116°~136°
13°~34°	115°~136°
24°~45°	104°~125°
24°~46°	103°~125°
24°~47°	102°~125°
24°~48°	101°~125°
24°~49°	100°~125°
25°~45°	104°~124°
25°~46°	103°~124°
25°~47°	102°~124°
25°~48°	101°~124°
25°~49°	100°~124°
26°~45°	104°~123°
26°~46°	103°~123°

26°~47°	102°~123°
26°~48°	101°~123°
26°~49°	100°~123°
27°~45°	104°~122°
27°~46°	103°~122°
27°~47°	102°~122°
27°~48°	101°~122°
27°~49°	100°~122°
28°~45°	104°~121°
28°~46°	103°~121°
28°~47°	102°~121°
28°~48°	101°~121°
28°~49°	100°~121°
29°~45°	104°~120°
29°~46°	103°~120°
29°~47°	102°~120°
29°~48°	101°~120°
29°~49°	100°~120°

5 Se prefiere que el oligómero de omisión del exón 55 de la presente invención consista en una secuencia complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 14° al 34° o 15° al 34°, desde el extremo 5' del exón 55° en el gen de la distrofina humana (p. ej., una cualquiera de las secuencias que consisten en los 157° al 177° o 157° al 176° de la SEQ ID NO: 5).

10 Se prefiere que el oligómero de omisión del exón 45 de la presente invención consista en una secuencia complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 1° al 21°, desde el extremo 5' del exón 45° en el gen de la distrofina humana (p. ej., cualquiera de las secuencias que consisten en los nucleótidos 156° al 176° de la SEQ ID NO: 6).

Se prefiere que el oligómero de omisión del exón 50 de la presente invención consista en una secuencia complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 107° al 127°, desde el extremo 5' del exón 50° en el gen de la distrofina humana (p. ej., una cualquiera de las secuencias que consisten en los nucleótidos 3° al 23° de la SEQ ID NO: 7).

15 Se prefiere que el oligómero de omisión del exón 44 de la presente invención consista en una secuencia complementaria a una cualquiera de las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 27° al 47° o 27° a 46°, desde el extremo 5' del exón 44° en el gen de la distrofina humana (p. ej., una cualquiera de las secuencias que consisten en los nucleótidos 117° al 138°, el 104° al 124°, el 103° al 123°, el 102° al 123° o el 102° al 122° o el 103° al 122° de la SEQ ID NO: 8).

20 El término "causar omisión del exón 55° en el gen de la distrofina humana" significa que mediante la unión del oligómero de la presente invención al sitio correspondiente al exón 55 del transcrito (p. ej., pre-ARNm) del gen de la distrofina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 56 está ligada al lado 3' de la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' del exón 53 en pacientes con DMD con delección del exón 54 cuando se corta y empalma el transcrito, resultando así en la formación de ARNm maduro que está libre de cambio de marco de codón.

30 El término "causar omisión del exón 45° en el gen de la distrofina humana" significa que mediante la unión del oligómero de la presente invención al sitio correspondiente al exón 45 del transcrito (p. ej., pre-ARNm) del gen de la distrofina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 46 se liga al lado 3' de la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' del exón 43 en pacientes con DMD con delección del exón 44 cuando se corta y empalma el transcrito, resultando así en la formación de ARNm maduro que está libre de cambio de marco de codón.

El término "causar omisión del exón 50° en el gen de la distrofina humana" significa que mediante la unión del oligómero de la presente invención al sitio correspondiente al exón 50 del transcrito (p. ej., pre-ARNm) del gen de la

distrofina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 52 está ligada al lado 3' de la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' del exón 49 en pacientes con DMD con delección del exón 51 cuando se corta y empalma el transcrito, resultando así en la formación de ARNm maduro que está libre de cambio de marco de codón.

El término "causar omisión del exón 44° en el gen de la distrofina humana" significa que mediante la unión del oligómero de la presente invención al sitio correspondiente al exón 44 del transcrito (p. ej., pre-ARNm) del gen de la distrofina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 46 está ligada al lado 3' de la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' del exón 43 en pacientes con DMD con delección del exón 45 cuando se corta y empalma el transcrito, resultando así en la formación de ARNm maduro que está libre de cambio de marco de codon.

Por consiguiente, no es necesario que el oligómero de la presente invención tenga una secuencia de nucleótidos 100% complementaria a cada secuencia diana, en la medida en que provoque la omisión del exón 55, 45, 50 o 44 en el gen de la distrofina humana. El oligómero de la presente invención puede incluir, por ejemplo, 1 a 3, 1 o 2, o un nucleótido no complementario a la secuencia diana.

En la presente memoria, el término "unión" descrito anteriormente significa que cuando el oligómero de la presente invención se mezcla con el transcrito del gen de la distrofina humana, ambos se hibridan en condiciones fisiológicas para formar una doble cadena. El término "en condiciones fisiológicas" se refiere a condiciones establecidas para imitar el entorno in vivo en términos de pH, composición salina y temperatura. Las condiciones son, por ejemplo, 25 a 40°C, preferiblemente 37°C, pH 5 a 8, preferiblemente pH 7.4 y concentración de cloruro de sodio 150 mM.

Si la omisión del exón 55, 45, 50 o 44 en el gen de la distrofina humana es causado o no se puede confirmar mediante la introducción del oligómero de la presente invención en una célula que expresa distrofina (p. ej., células de rhabdomyosarcoma humano), amplificando la región que rodea al exón 55, 45, 50 o 44 de ARNm del gen de la distrofina humana por RT-PCR a partir del ARN total de la célula que expresa la distrofina y realizando un análisis de secuencia o PCR anidado en el producto amplificado por PCR.

La eficiencia de omisión se puede determinar de la siguiente manera. El ARNm para el gen de la distrofina humana se recolecta de las células de prueba; en el ARNm, se mide el nivel de polinucleótido "A" de la banda donde se omite el exón 55, 45, 50 o 44 y se mide el nivel de polinucleótido "B" de la banda donde no se omite el exón 55, 45, 50 o 44. Utilizando estos valores de medición de "A" y "B", la eficacia se calcula mediante la siguiente ecuación:

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

El oligómero de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido, oligómero de morfolino o ácido nucleico peptídico (PNA, por sus siglas en inglés), que tiene una longitud de 18 a 28 nucleótidos. La longitud es preferiblemente de 15 a 30 nucleótidos o de 20 a 25 nucleótidos y se prefieren los oligómeros de morfolino.

El oligonucleótido descrito anteriormente (de aquí en adelante denominado "el oligonucleótido de la presente invención") es el oligómero 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 modificadas total o parcialmente, que constituyen el ribonucleótido o desoxirribonucleótido.

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

La modificación del resto de azúcar puede incluir, por ejemplo, modificaciones en la posición 2' de ribosa y modificaciones de las otras posiciones del azúcar. La modificación en la posición 2' de ribosa incluye el reemplazo del 2'-OH de ribosa con OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, 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 ribosa o desoxirribosa con S, con puente entre las posiciones 2' y 4' del azúcar, p. ej., LNA, por sus siglas en inglés (ácido nucleico bloqueado) o ENA (ácidos nucleicos con puentes de 2'-O, 4'-C-etileno), pero no se limita a los mismos.

Una modificación de la región de unión a fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de reemplazar el enlace fosfodiéster con enlace fosforotioato, enlace fosforoditioato, enlace fosfonato de alquilo, enlace fosforoamidato o

enlace boranofosfato (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154 -9160) (consúltese, *p. ej.*, Re-publicaciones nacionales japonesas de solicitudes PCT num. 2006/129594 y 2006/038608).

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

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

10 El halógeno incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

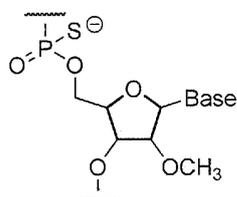
El alcoxi es un alcoxi lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono, como metoxi, etoxi, *n*-propoxi, isopropoxi, *n*-butoxi, isobutoxi, *sec*-butoxi, *terc*-butoxi, *n*-pentiloxi, isopentiloxi, *n*-hexiloxi, isohexiloxi, etc. Entre otros, se prefiere un alcoxi que tenga de 1 a 3 átomos de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

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

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

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

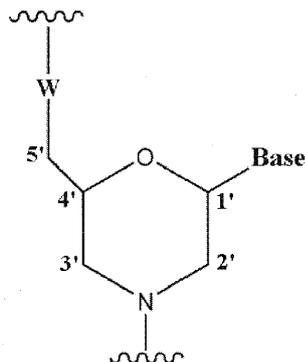
25 Preferiblemente, el oligonucleótido de la presente invención es el oligómero de la presente invención que contiene una unidad constituyente representada por la fórmula general a continuación en donde el grupo -OH en la posición 2' de ribosa está sustituido con metoxi y la región de unión a fosfato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



en donde Base representa una nucleobase.

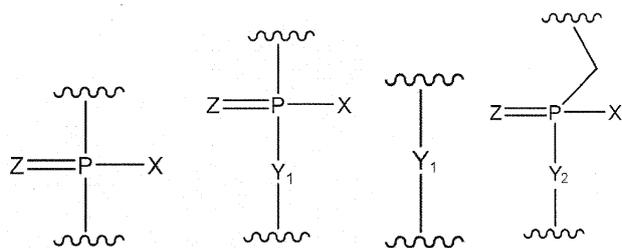
30 El oligonucleótido de la presente invención se puede sintetizar fácilmente utilizando diversos sintetizadores automáticos (*p. ej.*, AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). Alternativamente, la síntesis también puede confiarse a una organización de terceros (*p. ej.*, Promega Inc. o Takara Co.),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

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



35 en donde Base tiene el mismo significado que el definido anteriormente, y

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



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;

$\text{R}^1$  representa H o un alquilo;

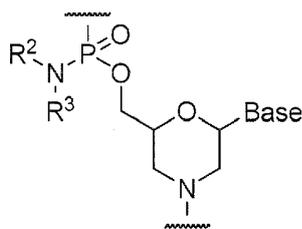
5  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$ , que pueden ser iguales o diferentes, cada uno representa H, un alquilo, un cicloalquilo o un arilo;

$\text{Y}^1$  representa O, S,  $\text{CH}_2$  o  $\text{NR}^1$ ;

$\text{Y}^2$  representa O, S o  $\text{NR}^1$ ;

Z representa O o S.

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

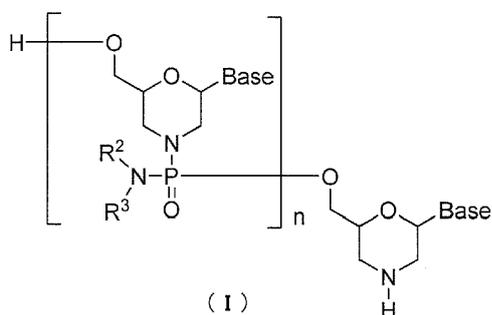


en donde Base,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

15 El oligómero de morfolino se puede producir de acuerdo con, *p. ej.*, el documento WO 1991/009033 o WO 2009/064471. En particular, el PMO se puede producir mediante el procedimiento descrito en el documento WO 2009/064471 o mediante el método que se muestra a continuación.

Método para producir PMO

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



20 en donde Base,  $\text{R}^2$  y  $\text{R}^3$  tienen el mismo significado que el definido anteriormente; y, n es un número entero entre 1 a 99, preferiblemente un número entero entre 18 a 28.

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

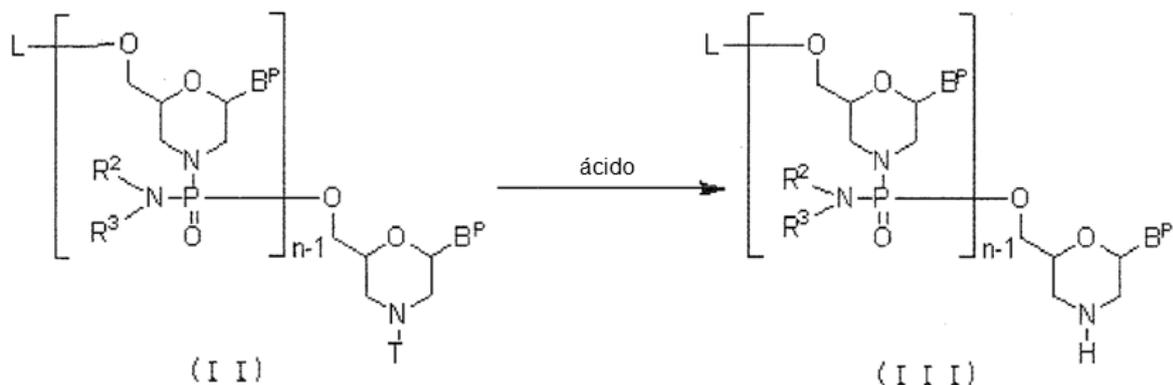
25 Los compuestos y reactivos utilizados en las etapas a continuación no están particularmente limitados siempre que se utilicen comúnmente para preparar PMO.

Además, las siguientes etapas se pueden llevar a cabo mediante el método de fase líquida o el método de fase sólida (utilizando manuales o sintetizadores automáticos de fase sólida disponibles comercialmente). Al producir PMO por el

método de fase sólida, se desea utilizar sintetizadores automáticos en vista de procedimientos de operación simples y síntesis precisa.

(1) Etapa A:

- 5 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)):

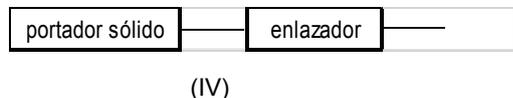


en donde n, R<sup>2</sup> y R<sup>3</sup> tienen el mismo significado que el definido anteriormente;

- 10 cada B<sup>P</sup> representa independientemente una nucleobase que se puede proteger 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)).



- 15 La "nucleobase" para B<sup>P</sup> incluye la misma "nucleobase" que, en la Base, siempre que el grupo amino o hidroxilo en la nucleobase mostrado por B<sup>P</sup> se pueda proteger.

- 20 Tal grupo protector para amino no está particularmente limitado siempre que se utilice como grupo protector para ácidos nucleicos. Los ejemplos específicos incluyen benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo y (dimetilamino)metileno. Los ejemplos específicos del grupo protector para el grupo hidroxilo incluyen 2-cianoetilo, 4-nitrofeniletilo, fenilsulfoniletilo, metilsulfoniletilo y trimetilsililetilo y fenilo, que pueden estar sustituidos por 1 a 5 grupos aceptores 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, (consúltese, p. ej., el documento WO 2009/064471).

- 25 El "portador sólido" no está particularmente limitado siempre que sea un portador utilizable para la reacción en fase sólida de ácidos nucleicos. Se desea que el portador sólido tenga las siguientes propiedades: p. ej., (i) es escasamente soluble en reactivos que se pueden utilizar para la síntesis de morfolino derivado de ácido nucleico (p. ej., diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, N-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético); (ii) es químicamente estable a los reactivos utilizables para la síntesis de morfolino derivado de ácido nucleico; (iii) se puede modificar químicamente; (iv) se puede cargar con morfolino derivado de ácido nucleico deseados; (v) tiene una resistencia suficiente para soportar alta presión a través de tratamientos; y (vi) tiene un intervalo y distribución de diámetro de partícula uniforme. Específicamente, poliestireno hinchable (p. ej., resina de aminometil poliestireno 1% dibencilbenceno reticulado (malla 200-400) (2.4-3.0 mmol/g) (fabricado por Tokyo Chemical Industry), resina de poliestireno aminometilado ·HCl [dibencilbenceno 1%, malla 100-200] (fabricado por Peptide Institute, Inc.)), poliestireno no hinchable (p. ej., Primer Support (fabricado por GE Healthcare)), poliestireno unido a la cadena PEG (p. ej., resina NH<sub>2</sub>-PEG (fabricado por Watanabe Chemical Co.), resina TentaGel, vidrio de poro controlado (vidrio de poro controlado; CPG) (fabricado por, p. ej., CPG), vidrio de poro controlado por oxalilo (consúltese, p. ej., Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), Soporte TentaGel-soporte obtenido a partir de aminopolietilenglicol (consúltese, p. ej., Wright et al., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), y un copolímero de Poros-poliestireno/divinilbenceno.

Un "enlazador" que se puede utilizar es un enlazador conocido generalmente utilizado para conectar ácidos nucleicos o morfolino derivado de ácido nucleico. Los ejemplos incluyen 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dietanolsulfonilo y un alquil amino de cadena larga (LCAA, por sus siglas en inglés).

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

El "ácido" que se puede utilizar en esta etapa incluye, por ejemplo, ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético y ácido tricloroacético. El ácido utilizado está apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 0.1 equivalentes molares a 1000 equivalentes molares basados en 1 mol de Compuesto (II), preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente molar a 100 equivalentes molares basados en 1 mol de Compuesto (II).

10 Se puede utilizar una amina orgánica en combinación con el ácido descrito anteriormente. La amina orgánica no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, trietilamina. La cantidad de la amina orgánica utilizada está apropiadamente en un intervalo de, *p. ej.*, 0.01 equivalentes molares a 10 equivalentes molares, y preferiblemente en un intervalo de 0.1 equivalentes molares a 2 equivalentes molares, basado en 1 mol del ácido.

15 Cuando se utiliza 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, una mezcla de 1 equivalente de trietilamina y 2 equivalentes de ácido trifluoroacético.

20 El ácido que se puede utilizar en esta etapa también se puede utilizar en forma de dilución con un disolvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%. El disolvente no está particularmente limitado 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 los mismos.

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

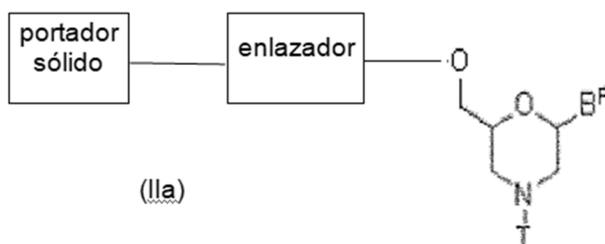
25 El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo de ácido utilizado y la temperatura de reacción, y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 minutos a 24 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

Después de completar esta etapa, se puede añadir una base, si es necesario, para neutralizar el ácido que permanece en el sistema. La "base" no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, diisopropilamina. La base también se puede utilizar en forma de una dilución con un disolvente apropiado en una concentración de 0.1% (v/v) a 30% (v/v).

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

35 El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo de base utilizada y la temperatura de reacción, y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 minutos a 24 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

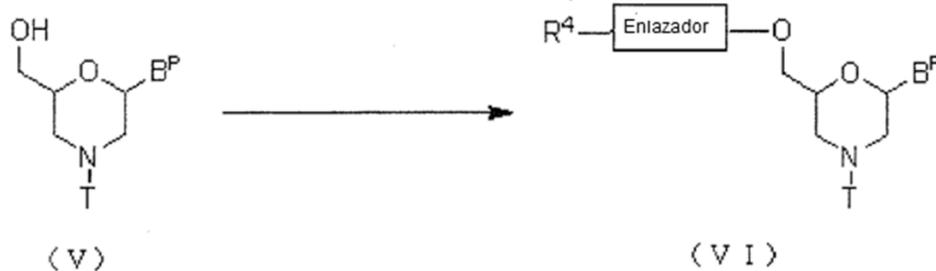
En el Compuesto (II), el compuesto de fórmula general (IIa) a continuación (de aquí en adelante Compuesto (IIa)), en donde n es 1 y L es un grupo (IV), se puede producir mediante el siguiente procedimiento.



40 en donde B<sup>F</sup>, T, enlazador y portador sólido tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

Etapa 1:

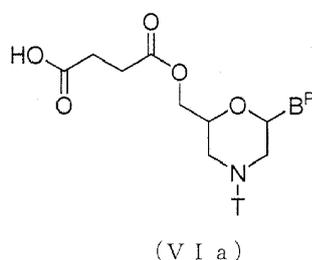
El compuesto representado por la fórmula general (V) a continuación se hace reaccionar con un agente acilante para preparar el compuesto representado por la fórmula general (VI) a continuación (de aquí en adelante denominado Compuesto (VI)).



en donde B<sup>P</sup>, T y enlazador tienen el mismo significado que el definido anteriormente; y, R<sup>4</sup> representa hidroxilo, un halógeno o amino.

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

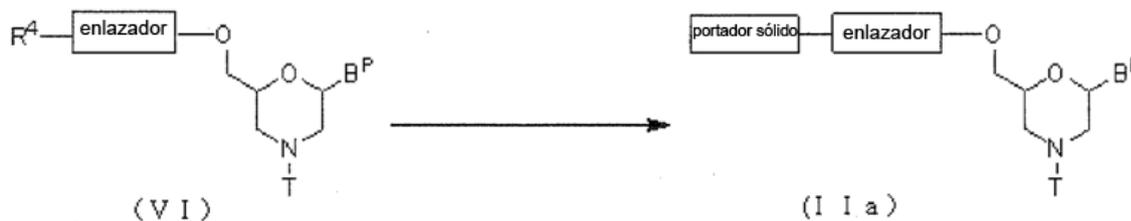
En particular, el compuesto representado por la fórmula general (VIa) a continuación se puede producir realizando el método conocido como esterificación, utilizando el Compuesto (V) y anhídrido succínico.



- 10 en donde B<sup>P</sup> y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

Etapa 2:

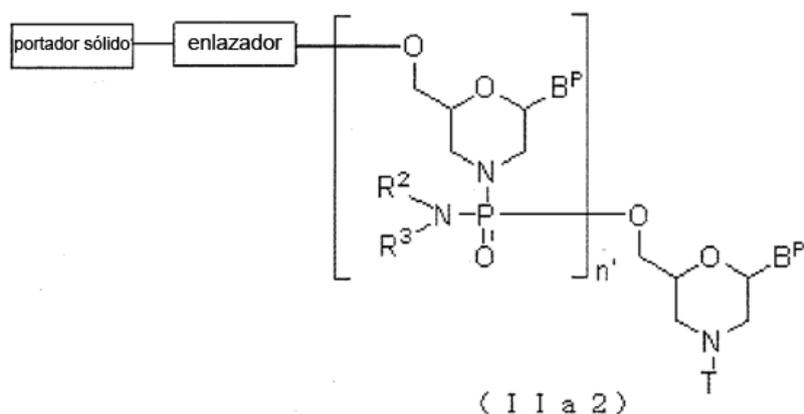
El Compuesto (VI) se hace reaccionar con un portador sólido por un agente de condensación para preparar el Compuesto (IIa).



- 15 en donde B<sup>P</sup>, R<sup>4</sup>, T, enlazador y portador sólido tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

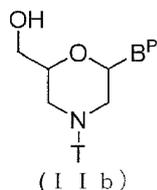
Esta etapa se puede realizar utilizando el Compuesto (VI) y un portador sólido de acuerdo con un método conocido como reacción de condensación.

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



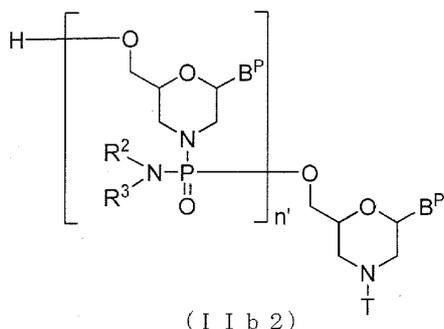
en donde  $B^P$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ , T, enlazador y portador sólido tienen el mismo significado que el definido anteriormente; y,  $n'$  representa 1 a 98.

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



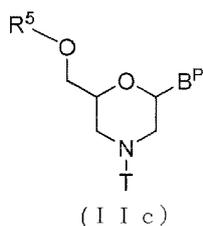
en donde  $B^P$  y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

- 10 En el Compuesto (II), el compuesto representado por la fórmula general (IIb2) a continuación en donde n es de 2 a 99 y L es hidrógeno se puede producir utilizando el Compuesto (IIb) como material de partida y repitiendo 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  $B^P$ ,  $n'$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

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



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



5 El compuesto de monómero de morfolino y la base que se pueden utilizar en esta etapa también se pueden utilizar como una dilución con un disolvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%. El disolvente no está particularmente limitado en la medida en que es inerte para la reacción, e incluye, por ejemplo, N,N-dimetilimidazolidona, N-metilpiperidona, DMF, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano o una mezcla de los mismos.

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

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

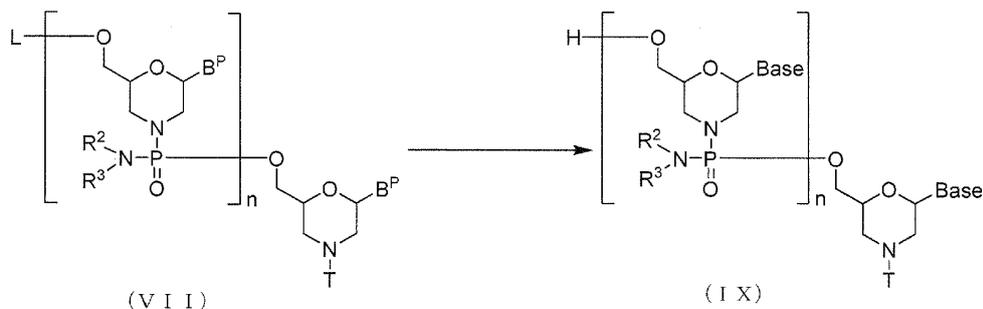
15 Además, después de completar esta etapa, se puede añadir un agente acilante, si es necesario. El "agente acilante" incluye, por ejemplo, anhídrido acético, cloruro de acilo y anhídrido fenoxiacético. El agente acilante también se puede utilizar como una dilución con un disolvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%. El disolvente no está particularmente limitado en la medida en que es inerte a la reacción, e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, un alcohol o alcoholes (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua o una mezcla de los mismos.

20 Si es necesario, una base tal como piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropiletilamina, N-etilmorfolina, etc. también se puede utilizar en combinación con el agente acilante. La cantidad del agente acilante está apropiadamente en un intervalo de 0.1 equivalentes molares a 10000 equivalentes molares, y preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente molar a 1000 equivalentes molares. La cantidad de la base está apropiadamente en un intervalo de, *p. ej.*, 0.1 equivalentes molares a 100 equivalentes molares, y preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente molar a 10 equivalentes molares, basado en 1 mol del agente acilante.

25 La temperatura de reacción en esta reacción está preferiblemente en un intervalo de 10°C a 50°C, más preferiblemente, en un intervalo de 10°C a 50°C, mucho más preferiblemente, en un intervalo de 20°C a 40°C, y lo más preferiblemente, en un intervalo de 25°C a 35°C. El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo de agente acilante utilizado y la temperatura de reacción, y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 minutos a 24 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

(3) Etapa C:

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



en donde Base, B<sup>P</sup>, L, n, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

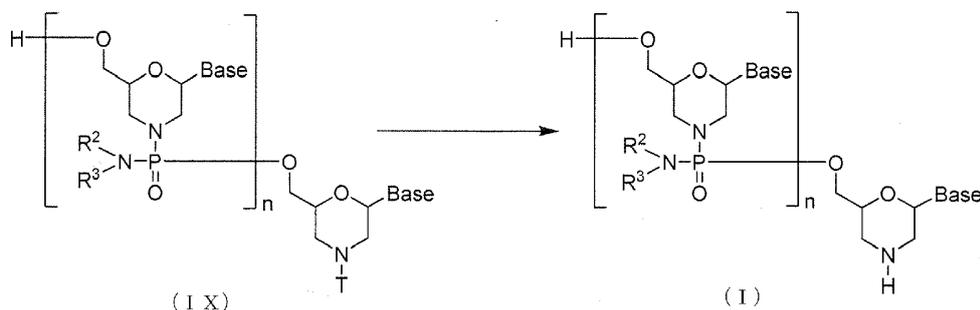
Esta etapa se puede realizar haciendo reaccionar el Compuesto (VII) con un agente desprotector.

35 El "agente desprotector" incluye, *p. ej.*, agua de amoníaco concentrada y metilamina. El "agente desprotector" utilizado en esta etapa también se puede utilizar como una dilución con, *p. ej.*, agua, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, DMF, N,N-dimetilimidazolidona, N-metilpiperidona, o una mezcla de estos disolventes. Entre otros, se prefiere el etanol. La cantidad del agente desprotector utilizado está apropiadamente en un intervalo de, *p. ej.*, 1 equivalente molar a 100000 equivalentes molares, y preferiblemente en un intervalo de 10 equivalentes molares a 1000 equivalentes molares, basado en 1 mol del Compuesto (VII).

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

45 (4) Etapa D:

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



en donde Base, n, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

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

El "ácido" que se puede utilizar en esta etapa incluye, por ejemplo, ácido tricloroacético, ácido dicloroacético, ácido acético, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, etc. El ácido utilizado se utiliza apropiadamente para permitir que la solución tenga un intervalo de pH de 0.1 a 4.0, y más preferiblemente, en un intervalo de pH 1.0 a 3.0. El disolvente no está particularmente limitado siempre que sea inerte para la reacción, e incluye, por ejemplo, acetonitrilo, agua o una mezcla de estos disolventes del mismo.

10

La temperatura de reacción está apropiadamente en un intervalo de 10°C a 50°C, preferiblemente, en un intervalo de 20°C a 40°C, y más preferiblemente, en un intervalo de 25°C a 35°C. El tiempo de reacción para la desprotección puede variar dependiendo del tipo de Compuesto (IX), temperatura de reacción, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 minutos a 5 horas, preferiblemente de 1 minuto a 1 hora, y más preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 30 minutos.

15

El PMO (I) se puede obtener sometiendo la mezcla de reacción obtenida en esta etapa a medios convencionales de separación y purificación tales como extracción, concentración, neutralización, filtración, separación centrífuga, recristalización, cromatografía en columna de fase inversa C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub>, cromatografía en columna de intercambio catiónico, cromatografía en columna de intercambio aniónico, cromatografía en columna de filtración en gel, cromatografía líquida de alto rendimiento, diálisis, ultrafiltración, etc., sola o en combinación. Por lo tanto, el PMO deseado (I) se puede aislar y purificar (consúltese, p. ej., el documento WO 1991/09033).

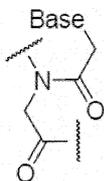
20

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

25

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

Un ácido nucleico peptídico es el oligómero de la presente invención que tiene un grupo representado por la siguiente fórmula general como la unidad constituyente:



en donde Base tiene el mismo significado que el definido anteriormente.

30 Los ácidos nucleicos peptídicos se pueden preparar haciendo referencia, p. ej., a las siguientes publicaciones.

1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)

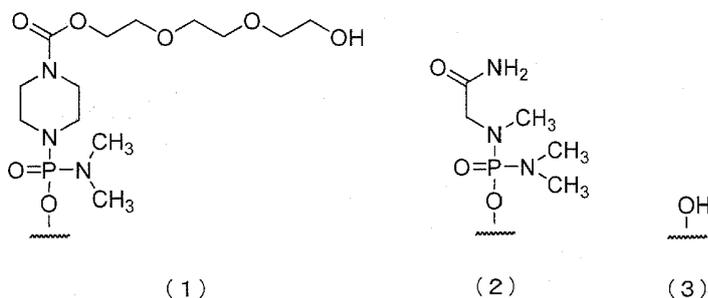
2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, JACS., 114, 1895 (1992)

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)

35 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 (1) a (3) a continuación, y preferiblemente es (3)-OH.



- 5 De aquí en adelante, los grupos mostrados por (1), (2) y (3) anteriormente denominados como "Grupo (1)", "Grupo (2)" y "Grupo (3)", respectivamente.

## 2. Composición farmacéutica

10 El oligómero de la presente invención provoca la omisión del exón 55, 45, 50 y 44 con una mayor eficacia en comparación con los oligómeros antisentido de la técnica anterior. Por lo tanto, se espera que las condiciones de distrofia muscular se puedan aliviar con alta eficiencia administrando la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención a pacientes con DMD. Por ejemplo, cuando se utiliza la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención, se pueden lograr los mismos efectos terapéuticos incluso en una dosis menor que la de los oligómeros de la técnica anterior. En consecuencia, los efectos secundarios se pueden aliviar y eso es económico.

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

20 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, dicitclohexilamina, *N,N'*-dibenziletildiamina, cloroprocaína, procaína, dietanolamina, *N*-bencilfeniletilamina, piperazina, tetrametilamonio, tris(hidroxiometil)aminometano; sales de hidroháluro tales como sales de hidrófluorados, hidrocloforos, hidrobromuros e hidroyoduros; sales de ácido inorgánico tales como nitratos, percloratos, sulfatos, fosfatos, etc.; alcanosulfonatos inferiores tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; arilsulfonatos tales como bencenosulfonatos y *p*-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartaratos, oxalatos, maleatos, etc.; y sales de aminoácidos tales como sales de glicina, lisina, arginina, ornitina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estas sales también pueden ser producidas por métodos conocidos. Alternativamente, el oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención puede estar en forma de un hidrato del mismo.

35 La vía de administración para la composición de la presente invención no está particularmente limitada siempre que sea una vía farmacéuticamente aceptable para la administración, y se puede elegir dependiendo del método de tratamiento. En vista de la facilidad de liberación a los tejidos musculares, se prefieren la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular, la administración subcutánea, la administración oral, la administración tisular, la administración transdérmica, etc. Además, las formas farmacéuticas que están disponibles para la composición de la presente invención no están particularmente limitadas e incluyen, por ejemplo, diversas inyecciones, agentes orales, goteos, inhalaciones, ungüentos, lociones, etc.

40 En la administración del oligómero de la presente invención a pacientes con distrofia muscular, la composición de la presente invención contiene preferiblemente un portador para promover el suministro del oligómero a los tejidos musculares. Tal portador no está particularmente limitado siempre que sea farmacéuticamente aceptable y los ejemplos incluyen portadores catiónicos tales como liposomas catiónicos, polímeros catiónicos, etc., o portadores que utilizan envoltura viral. Los liposomas catiónicos son, por ejemplo, liposomas compuestos de 2-O-(2-dietilaminoetil) carabamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y fosfolípidos como componentes esenciales (de aquí en adelante denominados "liposoma A"), Oligofectamina (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectin (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectamine (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectamine 2000 (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), DMRIE-C (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), GeneSilencer (marca registrada) (fabricado por Gene Therapy Systems), TransMessenger (marca registrada) (fabricado por QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (marca registrada) (fabricado por Mirus) y Nucleofector II (Lonza). Entre otros, se prefiere el liposoma A. Ejemplos de polímeros catiónicos son JetSI (marca registrada) (fabricado por Qbiogene, Inc.) y Jet-PEI (marca registrada) (polietilenimina, fabricado por Qbiogene, Inc.). Un ejemplo de portadores

que utilizan una envoltura viral es GenomeOne (marca registrada) (liposoma HVJ-E, fabricado por Ishihara Sangyo). Alternativamente, también se pueden utilizar los dispositivos médicos descritos en la patente japonesa nº 2924179 y los portadores catiónicos descritos en las re-publicaciones nacionales japonesas de solicitudes PCT nums. 2006/129594 y 2008/096690.

Una concentración del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención puede variar dependiendo del tipo de portador, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 nM a 100 µM, preferiblemente en un intervalo de 1 nM a 10 µM, y más preferiblemente en un intervalo de 10 nM a 1 µM. Una relación en peso del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención y el portador (portador/oligómero de la presente invención) puede variar dependiendo de la propiedad del oligómero, tipo de portador, etc., y es apropiadamente en un intervalo de 0.1 a 100, preferiblemente en un intervalo de 1 a 50, y más preferiblemente en un intervalo de 10 a 20.

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

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

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

La preparación liofilizada de la composición de la presente invención se puede utilizar en general tras la reconstitución añadiendo una solución adecuada opcional (líquido de reconstitución) y redisolviendo la preparación. Tal líquido de reconstitución incluye agua inyectable, solución salina fisiológica y otros fluidos de infusión. El volumen del líquido de reconstitución puede variar dependiendo del uso previsto, etc., no está particularmente limitado, y es adecuadamente de 0.5 a 2 veces mayor que el volumen antes de la liofilización o no más de 500 ml.

Se desea controlar una dosis de la composición de la presente invención a administrar, teniendo en cuenta los siguientes factores: el tipo y la forma farmacéutica del oligómero de la presente invención contenido; condiciones del paciente, incluyendo edad, peso corporal, etc. vía de administración; y las características y extensión de la enfermedad. Una dosis diaria calculada como la cantidad del oligómero de la presente invención está generalmente en un intervalo de 0.1 mg a 10 g/humano, y preferiblemente de 1 mg a 1 g/humano. Este intervalo numérico puede variar ocasionalmente dependiendo del tipo de enfermedad diana, vía de administración y molécula diana. Por lo tanto, una dosis más baja que el intervalo puede ser suficiente en alguna ocasión y, por el contrario, una dosis más alta que el intervalo puede ser requerida ocasionalmente. La composición se puede administrar de una vez a varias veces al día o a intervalos de un día a varios días.

En otra realización más de la composición de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector capaz de expresar el oligonucleótido de la presente invención y el portador descrito anteriormente. Tal vector de expresión puede ser un vector capaz de expresar una pluralidad de los oligonucleótidos de la presente invención. La composición se puede formular con aditivos farmacéuticamente aceptables como en el caso de la composición de la presente invención que contiene el oligómero de la presente invención. Una concentración del vector de expresión contenido en la composición puede variar dependiendo del tipo de portador, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 nM a 100 µM, preferiblemente en un intervalo de 1 nM a 10 µM, y más preferiblemente en un intervalo de 10 nM a 1 µM. Una relación en peso del vector de expresión contenido en la composición y el portador (portador/vector de expresión) puede variar dependiendo de la propiedad del vector de expresión, tipo de portador, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 a 100, preferiblemente en un intervalo de 1 a 50, y más preferiblemente en un intervalo de 10 a 20. El contenido del portador contenido en la composición es

el mismo que en el caso de la composición de la presente invención que contiene el oligómero de la presente invención, y un método para producir el mismo también es el mismo que en el caso con la composición de la presente invención.

### Ejemplos

- 5 De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los ejemplos y los ejemplos de prueba a continuación, pero no se considera que esté limitada a los mismos.

#### 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 amínica de poliestireno

- 10 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 se suspendieron 1.1 g de 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) en 50 ml de diclorometano, y se añadieron 0.90 g de anhídrido succínico a la suspensión, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. A la mezcla de reacción se le añadieron 10 ml de metanol, y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo utilizando acetato de etilo y solución acuosa de dihidrógeno fosfato de potasio 0.5 M. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con solución acuosa de dihidrógeno fosfato 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.

- 20 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 4.0 g de ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico se disolvió en 200 ml de piridina (deshidratada), se añadieron a la solución 0.73 g de 4-DMAP y 11.5 g de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida. Después, se añadieron a la mezcla 25.0 g de resina de amino poliestireno Primer support 200 amino (fabricado por GE Healthcare Japan Co., Ltd., 17-5214-97) y 8.5 mL de trietilamina, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 días. Una vez completada la reacción, la resina se retiró por filtración. La resina resultante se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano en el orden mencionado, y se secó a presión reducida. A la resina resultante se añadieron 200 ml de tetrahidrofurano (deshidratado), 15 ml de anhídrido acético y 15 ml de 2,6-lutidina, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se extrajo 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 midiendo la absorbancia UV a 409 nm utilizando un método conocido. La cantidad de carga de la resina fue de 192.2  $\mu\text{mol/g}$ .

#### Condiciones de medida UV

- 35 Aparato: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Disolvente: ácido metanosulfónico.

Longitud de onda: 265 nm

Longitud de onda: 26

#### Ejemplo de referencia 2

- 40 Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado en resina de aminopoliestireno

Etapa 1: Producción de N<sup>2</sup>-(fenoxiacetil) guanosina

La guanosina, 100 g, se secó a una temperatura de 80°C a presión reducida durante 24 horas. Después de añadir 500 ml de piridina (anhidra) y 500 ml de diclorometano (anhidro), se añadieron gota a gota 401 ml de clorotrimetilsilano a la mezcla bajo una atmósfera de argón a una temperatura de 0°C, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se volvió a enfriar con hielo y se añadieron gota a gota 66.3 g de cloruro de fenoxiacetilo. Enfriando con hielo, la mezcla se agitó durante 3 horas más. A la solución de reacción se le añadieron 500 ml de metanol y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó después por destilación a presión reducida. El residuo se añadió con 500 ml de metanol y se concentró a presión reducida, el proceso se realizó 3 veces. Al residuo se le añadieron 4 litros de agua y la mezcla se agitó durante una hora enfriando con hielo. Los precipitados formados se sacaron por filtración, se lavaron secuencialmente con agua y metanol frío y después

se secaron para dar 150.2 g del compuesto objetivo (rendimiento 102%) (consúltese: Org. Lett. (2004), Vol.6, No. 15, 2555-2557).

5 Etapa 2: p-toluenosulfonato de N<sup>9</sup>-{[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-morfolin-2-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il}-2-fenoxiacetamida

10 En 480 ml de metanol se suspendieron 30 g del compuesto obtenido en la Etapa 1, y se añadieron 130 ml de ácido clorhídrico 2N a la suspensión con enfriamiento con hielo. Posteriormente, 56.8 g de tetraborato de amonio tetrahidratado y 16.2 g de peryodato de sodio se añadieron a la mezcla en el orden mencionado y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla de reacción se enfrió con hielo y las materias insolubles se retiraron por filtración, seguido de lavado con 100 ml de metanol. El filtrado y el líquido de lavado se combinaron y la mezcla se enfrió con hielo. A la mezcla se le añadieron 11.52 g de 2-picolina borano. Después de agitar durante 20 minutos, se añadieron lentamente a la mezcla 54.6 g de monohidrato de ácido p-toluenosulfónico, seguido de agitación a una temperatura de 4°C durante la noche. Los precipitados formados se sacaron por filtración y se lavaron con 500 ml de metanol frío y se secaron para dar 17.7 g del compuesto objetivo (rendimiento: 43.3%).

15 <sup>1</sup>H RMN (ht. Los precipitados se tomaron o35 (1H, s), 7.55 (2H, m), 7.35 (2H, m), 7.10 (2H, d, J=7.82Hz), 7.00 (3H, m), 5.95 (1H, dd, J=10.64, 2.42Hz), 4.85 (2H, s), 4.00 (1H, m), 3.90-3.60 (2H, m), 3.50-3.20 (5H, m), 2.90 (1H, m), 2.25 (3H, s)

Etapa 3: Producción de N<sup>9</sup>-{(2R,6S)-6-hidroximetil-4-tritilmorfolin-2-il}-N<sup>2</sup>-(fenoxiacetil)guanina

20 En diclorometano (30 ml) se suspendieron 2.0 g del compuesto (2.0 g) obtenido en la Etapa 2, y se añadieron trietilamina (13.9 g) y cloruro de tritilo (18.3 g) a la suspensión con enfriamiento con hielo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La mezcla de reacción se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio y después con agua. La capa orgánica se recolectó, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. Al residuo se le añadió tampón de citrato de sodio 0.2 M (pH 3)/metanol (1:4 (v/v), 40 ml), y la mezcla se agitó. Posteriormente, se añadió agua (40 ml) y la mezcla de suspensión se agitó durante una hora con enfriamiento con hielo. Los precipitados se retiraron por filtración, se lavaron con metanol frío y se secaron para dar 1.84 g del compuesto objetivo (rendimiento: 82.0%).

Etapa 4: Producción de N<sup>9</sup>-{(2R,6S)-6-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-tritilmorfolin-2-il}-N<sup>2</sup>-(fenoxiacetil) guanina

30 En diclorometano (300 ml) se disolvió el compuesto (38.3 g) obtenido en la Etapa 3, y se añadieron imidazol (4.64 g) y cloruro de t-butildimetilsililo (9.47 g) a la solución en este orden mencionado bajo enfriamiento con hielo. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La solución de reacción se lavó con tampón de citrato de sodio 0.2 M (pH 3) y después con salmuera. La capa orgánica se recolectó, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida para dar 44.1 g del compuesto diana como producto bruto.

Etapa 5: Producción de N<sup>9</sup>-{(2R,6S)-6-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-tritilmorfolin-2-il}-N<sup>2</sup>-(fenoxiacetil)-O<sup>6</sup>-triisopropilbencenosulfonil guanina

35 En diclorometano (300 ml) se disolvió el compuesto (44.1 g) obtenido por la Etapa 4, y 4-dimetilaminopiridina (0.64 g), trietilamina (29.2 ml) y cloruro de triisopropilbencenosulfonilo (19.0 g) se añadieron a la solución con enfriamiento con hielo. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La solución de reacción se lavó con solución acuosa 1 M de dihidrógeno fosfato de sodio. La capa orgánica se recolectó, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida para dar 60.5 g del compuesto objetivo como producto bruto.

40 Etapa 6: Producción de N<sup>9</sup>-{(2R,6S)-6-((terc-butildimetilsililoxi)metil)-4-tritilmorfolin-2-il}-N<sup>2</sup>-(fenoxiacetil)-O<sup>6</sup>-(2-cianoetil) guanina

45 En diclorometano (300 ml) se disolvió el compuesto (60.5 g) obtenido en la Etapa 5, y se añadió N-metilpirrolidina (54.5 ml) a la solución con enfriamiento con hielo. La solución de reacción se agitó bajo enfriamiento con hielo durante una hora. Después, se añadieron cianohidrina de etileno (37.2 g) y 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-eno (11.96 g) a la solución, y la solución se agitó bajo enfriamiento con hielo durante 2 horas. La solución de reacción se lavó con solución de dihidrógeno fosfato de sodio 1 M y después con agua. La capa orgánica se recolectó, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida para dar 72.4 g del compuesto objetivo como producto bruto.

Etapa 7: Producción de N<sup>9</sup>-{(2R, 6S)-6-hidroximetil-4-tritilmorfolin-2-il}-N<sup>2</sup>-(fenoxiacetil)-O<sup>6</sup>-(2-cianoetil) guanina

50 En diclorometano (300 ml) se disolvió el compuesto (72.4 g) obtenido en la Etapa 6, y se añadió trihidrofluoruro de trietilamina (21.1 g) a la solución. La solución de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17 horas. La solución de reacción se vertió en una solución acuosa de bicarbonato sódico saturado frío para neutralizar la solución de reacción. Después, la capa de diclorometano se recolectó, se secó sobre sulfato de magnesio y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (PSQ100B (fabricado por FUJII SILYSIA CHEMICAL LTD. Lo mismo se aplicará de aquí en adelante.)) para dar 14.3 g del compuesto objetivo (rendimiento de la etapa 4: 39.2%).

55

Etapa 8: Producción de ácido 4-[[[(2S, 6S)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-(2-fenoxiacetil) amino]purin-9-il]-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado en resina de amino poliestireno

5 El compuesto del título se produjo de manera similar al ejemplo de referencia 1, excepto que se utilizó N<sup>9</sup>-[(2R,6S)-6-hidroxi metil-4-tritilmorfolin-2-il]-N<sup>2</sup>-(fenoxiacetil)-O<sup>6</sup>-(2-cianoetil) guanina en esta etapa, en lugar de utilizar N-{1-[(2R, 6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida en la Etapa 1 del ejemplo de referencia 1.

Ejemplo de referencia 3

10 Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno

El compuesto del título se produjo de manera similar al ejemplo de referencia 1, excepto que se utilizó 1-[(2R, 6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidina-2,4(1H, 3H)-diona en esta etapa, en lugar de utilizar N-{1-[(2R, 6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida en la etapa 1 del ejemplo de referencia 1.

Ejemplo de referencia 4

15 Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(6-benzamidapurina-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno

El compuesto del título se produjo de manera similar al ejemplo de referencia 1, excepto que se utilizó N-{9-[(2R, 6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]purina-6-il} benzamida en esta etapa, en lugar de utilizar N-{1-[(2R, 6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il} benzamida en la Etapa 1 del ejemplo de referencia 1.

20 Ejemplo de referencia 5

Ácido 1,12-dioxo-1-(4-tritilpiperazin-1-il)-2,5,8,11-tetraoxa-15-pentadecanoico cargado en resina de aminopoliestireno

25 El compuesto del título se produjo de manera similar al ejemplo de referencia 1, excepto que se utilizó en esta etapa ácido 2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etil 4-tritilpiperazin-1-carboxílico (el compuesto descrito en el documento WO2009 /064471), en lugar de N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il} benzamida utilizada en la Etapa 1 del ejemplo de referencia 1.

Exon 45

De acuerdo con las descripciones en los ejemplos 1 a 8 y el ejemplo de referencia 1 a continuación, se sintetizaron varios tipos de PMO mostrados por los PMO nums. 1-6 y 8-10 en la tabla 5. El PMO sintetizado se disolvió en agua para inyección (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). PMO n° 7 se compró a Gene Tools, LLC.

30 Tabla 5

PMO n°	Nombre de secuencia	Nota	SEQ ID NO:
1	H45 -2-19(OH)	extremo 5': grupo (3)	9
2	H45_-1-20(OH)	extremo 5': grupo (3)	10
3	H45_1-21(OH)	extremo 5': grupo (3)	11
4	H45_2-22(OH)	extremo 5': grupo (3)	12
5	H45_3-23(OH)	extremo 5': grupo (3)	13
6	H45_-4-21(OH)	Secuencia correspondiente a la SEQ ID NO; 30 en el documento de patente 4, extremo 5': grupo (3)	14
7	H45_5-34(GT)	Secuencia correspondiente a la SEQ ID NO; 4 en el documento de patente 3, extremo 5': grupo (2)	15
8	H45_1-20(OH)	extremo 5': grupo (3)	16
9	H45_2-21(OH)	extremo 5': grupo (3)	17
10	H45_1-21(TEG)	extremo 5': grupo (1)	18

Ejemplo 1

PMO. N° 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 sobre una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de referencia 1) (26  $\mu$ mol) se rellenó en una columna con un cabezal de filtro. Después, el ciclo sintético que se muestra a continuación se inició utilizando una máquina de síntesis de ácido nucleico (AKTA Oligopilot 10 plus). El compuesto de monómero de morfolino deseado se añadió en cada ciclo de acoplamiento para dar la secuencia de nucleótidos del compuesto del título.

Tabla 6

Etapa	Reactivo	Volumen (mL)	Tiempo (min)
1	solución desbloqueante	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	mezcla de reactivos de la etapa 3 y etapa 4	6.3	120-300
6	acetonitrilo	20	1.0
7	solución desactivante	9	2.0
8	acetonitrilo	30	2.0

La solución desbloqueante utilizada fue diclorometano que contenía 3% (p/v) de ácido trifluoroacético. La solución neutralizante y de lavado utilizada fue una solución obtenida disolviendo N,N-diisopropiletilamina para ser 10% (v/v) y tetrahydrofurano para ser 5% (v/v) en diclorometano que contenía acetonitrilo al 35% (v/v). La solución de acoplamiento A utilizada fue una solución obtenida disolviendo el compuesto de monómero de morfolino en tetrahydrofurano para ser 0.10 M. La solución de acoplamiento B utilizada fue una solución obtenida disolviendo N,N-diisopropiletilamina para ser 20% (v/v) y tetrahydrofurano para ser 10% (v/v) en acetonitrilo. La solución de protección utilizada fue una solución obtenida disolviendo 20% (v/v) de anhídrido acético y 30% (v/v) de 2,6-lutidina en acetonitrilo.

La resina de amino poliestireno 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 resina de amino poliestireno se cargó en un recipiente de reacción, y se añadieron a la misma 5 ml de 28% de agua amoniaca-etanol (1/4). La mezcla se agitó a una temperatura de 55°C durante 15 horas. La resina de aminopoliestireno se separó por filtración y se lavó con 1 ml de agua-etanol (1/4). El filtrado resultante se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 10 ml de una mezcla de disolventes de 20 mM de ácido acético-tampón de 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 utilizadas son las siguientes.

Tabla 7

Columna	XBridge 5 $\mu$ m C18 (Waters, $\phi$ 19×50 mm, 1 CV=14 ml)
Velocidad de flujo	10 mL/min
Temperatura de la columna	Tempertura ambiente
Solución A	20 mM de tampón TEAA
Solución B	CH <sub>3</sub> CN
Gradiente	(B) conc. 10→70% /15 CV

Se analizó cada fracción y el producto objetivo se recuperó y se concentró a presión reducida. Al residuo concentrado se añadieron 0.5 ml de solución acuosa de ácido fosfórico 2 M, y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Además, se añadieron 2 ml de solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M para hacer la mezcla alcalina, seguido de filtración a través de un filtro de membrana (0.45  $\mu$ m).

La solución acuosa resultante que contiene el producto objetivo se purificó mediante una columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones utilizadas son las siguientes.

Tabla 8

Columna	Fuente 15Q (GE Healthcare, φ 10×108 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

5 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 neutralización. A continuación, la mezcla obtenida se desmineralizó por HPLC de fase inversa en las condiciones que se describen a continuación.

Tabla 9

Columna	XBridge 5 μm C8 (Waters, φ 10×50 mm, 1 CV=4 ml)
Velocidad de flujo	4 ml/min
Temperatura de la columna	60°C
Solución A	agua
Solución B	CH <sub>3</sub> CN
Gradiente	(B) conc. 0 → 50%/20CV

10 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 1.5 mg del compuesto objetivo como un sólido blanco similar al algodón.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6877.8
	Observado: 6877.4

Ejemplo 2

PMO. Nº 3

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6862.8
	Observado: 6862.5

15

Ejemplo 3

PMO. Nº 2

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6862.8
	Observado: 6862.3

20 Ejemplo 4

PMO. Nº 4

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[(2S, 6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purin-9-il]-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6902.8
	Observado: 6902.3

5

Ejemplo 5

PMO. Nº 5

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

10

ESI-TOF-MS	Calculado: 6902.8
	Observado: 6902.4

Ejemplo 6

PMO. Nº 8

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6547.5
	Observado: 6547.2

15

Ejemplo 7

PMO. Nº 9

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6547.5
	Observado: 6547.2

20

Ejemplo 8

PMO. Nº 10

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 1,12-dioxo-1-(4-tritilpiperazin-1-il)-2,5,8,11-tetraoxa-15-pentadecanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 5) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 7214.1
	Observado: 7213.7

25

Ejemplo comparativo 1

PMO. Nº 6

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1.

ESI-TOF-MS	Calculado: 8193,9
	Observado: 8195,3

## Ejemplo de prueba 1

## Ensayo in vitro

- 5 Los experimentos se realizaron utilizando los oligómeros antisentido de 2'-O-metoxi-fosforotioatos (2'-OMe-S-RNA) mostrados por la SEQ ID NO: 19 a la SEQ ID NO: 35. Se compraron a Japan Bio Services varios oligómeros antisentido utilizados para el ensayo. Las secuencias de varios oligómeros antisentido se dan a continuación.

Tabla 10

Oligómero antisentido	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
H45_1-25	GCUGCCCAAUGCCAUCCUGGAGUUC	19
H45_6-30	UUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUGG	20
H45_11-35	ACAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAU	21
H45_16-40	UGACAACAGUUUGCCGCUGCCCAAU	22
H45_21-45	UGUUCUGACAACAGUUUGCCGCUGC	23
H45_26-50	UUCAUUGUUCUGACAACAGUUUGCC	24
H45_31-55	UUGCAUUCAAUGUUCUGACAACAGU	25
H45_36-60	CCCAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACA	26
H45_41-65	UCUCCCCAGUUGCAUUCAAUGUUC	27
H45_46-70	UUAUUUCUCCCCAGUUGCAUUCAA	28
H45_51-75	CUGAAUUUUUCUCCCCAGUUGCA	29
H45_56-80	GAUUGCUGAAUUUUUCUCCCCAG	30
H45_61-85	UUGAGGAUUGCUGAAUUUUUCUUC	31
H45_66-90	UGUUUUUGAGGAUUGCUGAAUUUU	32
H45_71-95	GCAUCUGUUUUUGAGGAUUGCUGAA	33
H45_76-100	UACUGGCAUCUGUUUUUGAGGAUUG	34
H45_7-31	UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG	35

- 10 Las células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano) se colocaron en placas a  $1 \times 10^5$  en una placa de 12 pocillos y se cultivaron en 1 ml de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés) (fabricado por Sigma, Inc., de aquí en adelante el mismo) que contiene 10% de suero fetal bovino (FCS, por sus siglas en inglés) (fabricado por Invitrogen Corp.) en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante la noche. Se prepararon complejos de varios oligómeros antisentido (Japan Bio Services) (0.3 o 1 µM) para omisión del exón 45 y Lipofectamine 2000 (fabricado por Invitrogen Corp.) y se añadieron 100 µL del complejo a las células RD donde se añadieron 0.9 mL del medio intercambiado, para alcanzar la concentración final de 30 o 100 nM.

- 15 Después de completar la adición, las células se cultivaron durante la noche. Las células se lavaron dos veces con PBS (fabricado por Nissui, de aquí en adelante el mismo) y después se añadieron a las células 250 µl de ISOGEN (fabricado por Nippon Gene). Después de dejar reposar las células a temperatura ambiente durante unos minutos para la lisis celular, el lisado se recolectó en un tubo Eppendorf. El ARN total se extrajo según el protocolo adjunto a ISOGEN. La concentración del ARN total extraído se determinó utilizando un NanoDrop ND-1000 (fabricado por LMS).

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

50°C, 30 minutos: transcripción inversa

- 25 94°C, 15 minutos: desnaturalización térmica

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

72°C, 10 minutos:

Las secuencias de nucleótidos del cebador directo y el cebador inverso utilizados para RT-PCR se dan a continuación.

Cebador directo: 5'- GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (SEQ ID NO: 36)

Cebador inverso: 5'- GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (SEQ ID NO: 37)

- 5 El producto de reacción, 1  $\mu$ L de la PCR anterior se analizó utilizando un Bioanalizador (fabricado por Agilent Technologies, Inc.). Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con omisión del exón 45 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin omisión del exón 45. En base a estos valores de medición de "A" y "B", la eficacia de omisión se determinó mediante la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

- 10 Los resultados son visibles en las FIG. 1 y 2. Estos experimentos revelaron que, cuando los oligómeros antisentido se diseñaron en los nucleótidos 1° al 25°, o del 6° al 30° del extremo 5' del exón 45 en el gen de la distrofina humana, la omisión del exón 45 podría ser causada con una eficacia más alta que la del oligómero antisentido que está diseñado en los nucleótidos 7° al 31° desde el extremo 5' del exón 45.

Ejemplo de prueba 2

- 15 Ensayo in vitro

Utilizando un kit Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L en Nucleofector II (Lonza), 1, 3 o 10  $\mu$ M de los oligómeros PMO n° 1 a 5 y 8 a 10 de la presente invención y los oligómeros antisentido PMO n° 6 y 7 fueron transfectados con  $3.5 \times 10^5$  de células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano). Se utilizó el programa T-030.

- 20 Después de la transfección, las células se cultivaron durante 3 días en 2 ml de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (fabricado por Sigma, de aquí en adelante el mismo) que contiene 10% de suero fetal bovino (FCS) (fabricado por Invitrogen) en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se lavaron dos veces con PBS (fabricado por Nissui, de aquí en adelante el mismo) y se añadieron a las células 500  $\mu$ l de ISOGEN (fabricado por Nippon Gene). Después de dejar reposar las células a temperatura ambiente durante unos minutos para lisar las células, el lisado se recolectó 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 utilizando un NanoDrop ND-1000 (fabricado por LMS).

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

50°C, 30 minutos: transcripción inversa

- 30 95°C, 15 minutos: desnaturalización térmica

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

72°C, 10 minutos:

Las secuencias de nucleótidos del cebador directo y el cebador inverso utilizados para RT-PCR se dan a continuación.

Cebador directo: 5'- GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (SEQ ID NO: 36)

- 35 Cebador inverso: 5'- GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (SEQ ID NO: 37)

El producto de reacción, 1  $\mu$ L, de la PCR anterior se analizó utilizando un Bioanalizador (fabricado por Agilent Technologies, Inc.).

- 40 Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con omisión del exón 45 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin omisión del exón 45. En base a estos valores de medición de "A" y "B", la eficacia de omisión se determinó mediante la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

- 45 Los resultados son visibles en las FIG. 3, 4, 14 y 15. Estos experimentos revelaron que los oligómeros PMO n° 1 y 3 de la presente invención causaron la omisión del exón 45 con una eficacia equivalente al oligómero antisentido PMO n° 6 en células RD (FIG. 3, 4). Además, los experimentos revelaron que los oligómeros PMO n° 1, 2 y 3 de la presente invención causaron la omisión del exón 45 con una mayor eficacia que el oligómero antisentido PMO n° 7 (FIG. 14). Además, los experimentos revelaron que el oligómero PMO n° 3 causó la omisión del exón 45 con una eficacia más alta que el oligómero antisentido PMO n° 10 cuya estructura final es diferente de la de PMO N° 3 (FIG. 15).

Ejemplo de prueba 3

Ensayo in vitro utilizando fibroblastos humanos

5 El gen myoD humano (SEQ ID NO: 38) se introdujo en las células GM05017 (fibroblastos derivados de DMD humano, Instituto Coriell para Investigación Médica) utilizando un vector retroviral de coexpresión ZsGreen1.

Después de la incubación durante 4 a 5 días, los fibroblastos transformados con MyoD positivo para ZsGreen se recolectaron mediante FACS y se colocaron en placas a  $5 \times 10^4/cm^2$  en una placa de 12 pocillos. Como medio de crecimiento, se utilizó 1 ml de medio Eagle modificado de Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM · F-12) (Invitrogen Corp.) que contiene 10% de FCS y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) (Sigma- Aldrich, Inc).

10 El medio fue reemplazado 24 horas después por un medio de diferenciación (DMEM/F-12 que contenía 2% de suero equino (Invitrogen Corp.), 1% de P/S y suplemento de medios líquidos ITS (Sigma, Inc.)). El medio se cambió cada 2 a 3 días y se continuó la incubación durante 12 a 14 días para diferenciarse en miotubos.

15 Posteriormente, el medio de diferenciación se reemplazó por un medio de diferenciación que contenía Endo-Porter 6  $\mu M$  (Gene Tools), y se añadió un oligómero de morfolino al mismo a una concentración final de 10  $\mu M$ . Después de la incubación durante 48 horas, se extrajo el ARN total de las células utilizando un TRIzol (fabricado por Invitrogen Corp.). La RT-PCR se realizó con 50 ng del ARN total extraído utilizando un kit QIAGEN OneStep RT-PCR. Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se utilizó un iCycler (fabricado por Bio-Rad) como un termociclador. El programa de RT-PCR utilizado es el siguiente.

50°C, 30 minutos: transcripción inversa

20 95°C, 15 minutos: desnaturalización térmica

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

72°C, 7 minutos: inactivación térmica de la polimerasa

Los cebadores utilizados fueron hDMD44F y hDMD46R.

hDMD44F: 5'-CCTGAGAATTGGGAACATGC-3' (SEQ ID NO: 39)

25 hDMD46R: 5'- TTGCTGCTCTTTTCCAGGTT-3' (SEQ ID NO: 40)

30 El producto de reacción de RT-PCR anterior se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2% y las imágenes de gel se capturaron con un GeneFlash (Syngene). El nivel de polinucleótido "A" de la banda con omisión del exón 45 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin omisión del exón 45 se midieron utilizando una imagen J (fabricada por los Institutos Nacionales de Salud). En base a estos valores de medición de "A" y "B", la siguiente ecuación determinó la eficacia de omisión.

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

Resultados experimentales

Los resultados se muestran en la FIG. 5. Este experimento reveló que el oligómero PMO n° 3 de la presente invención causó la omisión del exón 45 con una alta eficacia en las células GM05017.

35 Exon 55

De acuerdo con las descripciones en los ejemplos 9 a 19 a continuación, se sintetizaron varios tipos de PMO mostrados por los PMO n° 11-14 y 16-22 en la tabla 11. El PMO sintetizado se disolvió en agua para inyección (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). PMO n° 15 fue adquirido de Gene Tools, LLC.

Tabla 11

PMO n°	Nombre de secuencia	Nota	SEQ ID NO:
11	H55_2-22(OH)	extremo 5': grupo (3)	41
12	H55_8-28(OH)	extremo 5': grupo (3)	42
13	H55_11-31(OH)	extremo 5': grupo (3)	43
14	H55_14-34(OH)	extremo 5': grupo (3)	44
15	H55_139-156(GT)	Secuencia correspondiente a h55AON6 en el documento de patente 5, extremo 5': grupo (2)	115

PMO nº	Nombre de secuencia	Nota	SEQ ID NO:
16	H55_12-32(OH)	extremo 5': grupo (3)	45
17	H55_13-33(OH)	extremo 5': grupo (3)	46
18	H55_15-35(OH)	extremo 5': grupo (3)	47
19	H55_16-36(OH)	extremo 5': grupo (3)	48
20	H55_14-33(OH)	extremo 5': grupo (3)	116
21	H55_15-34(OH)	extremo 5': grupo (3)	117
22	H55_14-34(TEG)	extremo 5': grupo (3)	118

Ejemplo 9

PMO. Nº 11

- 5 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(6-benzamida prino-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como el material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6807.8
	Observado: 6807.0

Ejemplo 10

10 PMO. Nº 12

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6822.8
	Observado: 6822.5

Ejemplo 11

15 PMO. Nº 13

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6837.8
	Observado: 6837.3

20 Ejemplo 12

PMO. Nº 14

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(6-benzamida prino-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6861.8
	Observado: 6861.4

25

Ejemplo 13

PMO. Nº 16

- 5 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6812.8
	Observado: 6812.7

Ejemplo 14

PMO. Nº 17

- 10 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S,6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi)-4-oxo-butanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6852.8
	Observado: 6852.7

Ejemplo 15

PMO. Nº 18

- 15 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S,6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi)-4-oxo-butanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6901.8
	Observado: 6901.5

Ejemplo 16

- 20 PMO. Nº 19

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6901.8
	Observado: 6901.7

- 25 Ejemplo 17

PMO. Nº 20

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S,6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi)-4-oxo-butanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6522.5
	Observado: 6522.0

- 30

Ejemplo 18

PMO. Nº 21

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S, 6R)-6-(6-benzamida prino-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6546.5
	Observado: 6546.0

5

Ejemplo 19

PMO. N° 22

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 1,12-dioxo-1-(4-tritilpiperazin-1-il)-2,5,8,11-tetraoxa-15-pentadecanoico (ejemplo de referencia 5) cargado en resina de aminopoliestireno como material de partida.

10

ESI-TOF-MS	Calculado: 7213.1
	Observado: 7212.5

Ejemplo de prueba 4

Ensayo in vitro

Los experimentos se realizaron utilizando los oligómeros antisentido de 2'-O-metoxi-fosforotioatos (2'-OMe-S-RNA) mostrados por la SEQ ID NO: 49 a la SEQ ID NO: 68. Se compraron varios oligómeros antisentido utilizados para el ensayo de Japan Bio Services. Las secuencias de varios oligómeros antisentido se dan a continuación.

15

Tabla 12

Oligómero antisentido	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
H55_1-21	GCAGCCUCUCGCUCACUCACC	49
H55_6-26	CCAAAGCAGCCUCUCGCUCAC	50
H55_11-31	UUCUCCAAAGCAGCCUCUCG	51
H55_21-41	AUCUAUGAGUUUCUCCAAAG	52
H55_31-51	UGUUGCAGUAAUCUAUGAGUU	53
H55_41-61	CAGGGGGAACUGUUGCAGUAA	54
H55_51-71	UUUCCAGGUCCAGGGGGAACU	55
H55_61-81	GCAAGAAACUUUCCAGGUCC	56
H55_71-91	UGUAAGCCAGGCAAGAAACUU	57
H55_81-101	UUUCAGCUUCUGUAAGCCAGG	58
H55_91-111	UUGGCAGUUGUUUCAGCUUCU	59
H55_101-121	CUGUAGGACAUUGGCAGUUGU	60
H55_111-131	GGGUAGCAUCCUGUAGGACAU	61
H55_121-141	CUUCCUJACGGGUAGCAUCC	62
H55_131-151	UUCUAGGAGCCUUCCUJACG	63
H55_141-161	CCUUGGAGUCUUCUAGGAGCC	64
H55_151-171	UCUUUUACUCCCUUGGAGUCU	65
H55_161-181	UUUCAUCAGCUCUUUUACUCC	66
H55_171-190	UUGCCAUGUUUCAUCAGCU	67
H55_104-123	UCCUGUAGGACAUUGGCAGU	68

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del Exón 45 (ejemplo de prueba 1), excepto que la RT-PCR se realizó utilizando los cebadores siguientes.

Cebador directo: 5'- CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3' (SEQ ID NO: 69)

5 Cebador inverso: 5'- CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3' (SEQ ID NO: 70)

Resultados experimentales

Los resultados son visibles en las FIG. 6 y 7. Estos experimentos revelaron que, cuando los oligómeros antisentido se diseñaron en los nucleótidos 1° al 21°, o del 11° al 31° desde el extremo 5' del exón 55 en el gen de la distrofina humana, la omisión del exón 55 de estos oligómeros antisentido se podría producir con una eficacia mayor que la del oligómero antisentido que está diseñado en los nucleótidos 104° al 123° desde el extremo 5' del exón 55.

Ejemplo de prueba 5

Ensayo in vitro

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del exón 45 (ejemplo de prueba 2), excepto que la RT-PCR se realizó utilizando los cebadores a continuación.

15 Cebador directo: 5'- CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3' (SEQ ID NO: 69)

Cebador inverso: 5'- CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3' (SEQ ID NO: 70)

Resultados experimentales

Los resultados son visibles en las FIG. 8, 16 y 17. Estos experimentos revelaron que en las células RD, los oligómeros PMO n° 12, 13 y 14 (H55\_8-28 (OH), H55\_11-31 (OH) y H55\_14-34 (OH)) de la presente invención causaron la omisión del exón 55 con una alta eficacia (FIG. 8). Además, los oligómeros PMO n° 14, 16, 17, 18 y 19 (H55\_14-34 (OH), H55\_12-32 (OH), H55\_13-33 (OH), H55\_15-35 (OH) y H55\_16-36 (OH)) de la presente invención se descubrió que causaban una omisión del exón 55 con una eficacia notablemente mayor que la del oligómero antisentido PMO n° 15 (H55\_139-156 (GT)) en las células RD (FIG. 16). Se descubrió que el oligómero PMO n°14 de la presente invención y el oligómero PMO n° 21 (H55\_15-34 (OH)), que es una base más corta que el oligómero PMO n° 14, causan la omisión del exón 55 con la misma eficiencia (FIG. 17). Además, los experimentos revelaron que el oligómero PMO n° 14 de la presente invención causó la omisión del exón 55 con la misma eficacia que el oligómero PMO n° 22 (H55\_14-34 (TEG)), que tiene una estructura final diferente de la del oligómero PMO n° 14 (FIG. 17).

Exon 44

De acuerdo con las descripciones en los ejemplos 20 a 29 a continuación, se sintetizaron varios tipos de PMO mostrados por los PMO n° 23-29 y 31-33 en la tabla siguiente. El PMO sintetizado se disolvió en agua para inyección (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). PMO n° 30 fue adquirido de Gene Tools, LLC.

Tabla 13

PMO n°	Nombre de secuencia	Nota	SEQ ID NO:
23	H44_23-43(OH)	extremo 5': grupo (3)	71
24	H44_25-45(OH)	extremo 5': grupo (3)	72
25	H44_26-46(OH)	extremo 5': grupo (3)	73
26	H44_27-47(OH)	extremo 5': grupo (3)	74
27	H44_28-48(OH)	extremo 5': grupo (3)	75
28	H44_29-49(OH)	extremo 5': grupo (3)	76
29	H44_30-50(OH)	extremo 5': grupo (3)	77
30	H44_10-39(GT)	Secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 1 en el documento de patente 3, extremo 5' : grupo (2)	78
31	H44_27-46(OH)	extremo 5': grupo (3)	79
32	H44_28-47(OH)	extremo 5': grupo (3)	80
33	H44_27-47(TEG)	extremo 5': grupo (1)	81

Ejemplo 20

PMO. Nº 23

- 5 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6918.9
	Observado: 6918.3

Ejemplo 21

PMO. Nº 24

- 10 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6903.9
	Observado: 6904.2

Ejemplo 22

- 15 PMO. Nº 25

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(6-benzamida primo-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6912.9
	Observado: 6912.4

- 20 Ejemplo 23

PMO. Nº 26

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6903.9
	Observado: 6904.4

- 25

Ejemplo 24

PMO. Nº 27

- 30 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(6-benzamida primo-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6927.9
	Observado: 6927.4

Ejemplo 25

PMO. Nº 28

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6942.9
	Observado: 6942.3

5

Ejemplo 26

PMO. N° 29

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

10

ESI-TOF-MS	Calculado: 6917.9
	Observado: 6918.3

Ejemplo 27

PMO. N° 31

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(6-benzamida primo-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como material de partida.

15

ESI-TOF-MS	Calculado: 6573,6
	Observado: 6572,4

Ejemplo 28

PMO. N° 32

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

20

ESI-TOF-MS	Calculado: 6588.6
	Observado: 6588.3

Ejemplo 29

PMO. N° 33

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 1,12-dioxo-1-(4-tritilpiperazin-1-il)-2,5,8,11-tetraoxa-15-pentadecanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 5) como material de partida.

25

ESI-TOF-MS	Calculado: 7255.2
	Observado: 7254.7

Ejemplo de prueba 6

30 Ensayo in vitro

Los experimentos se realizaron utilizando los oligómeros antisentido de 2'-O-metoxi-fosforotioatos (2'-OMe-S-ARN) mostrados por la SEQ ID NO: 82 a la SEQ ID NO: 95 y la SEQ ID NO: 109 a la SEQ ID NO: 118. Se compraron varios oligómeros antisentido utilizados para el ensayo de Japan Bio Services. Las secuencias de varios oligómeros antisentido se dan a continuación.

Tabla 14

Oligómero antisentido	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
H44_1-22	CUCAACAGAUCUGUCAAAUCGC	82
H44_6-27	CAUUUCUCAACAGAUCUGUCA	105
H44_11-32	GCCGCCAUUUCUCAACAGAUCU	83
H44_16-37	AAAACGCCGCCAUUUCUCAACA	106
H44_21-42	UAAUGAAAACGCCGCCAUUUCU	84
H44_26-47	UAUCAUAAUGAAAACGCCGCCA	85
H44_31-52	CUUUUAUCAUAAUGAAAACGC	86
H44_36-57	AAUAUCUUUAUCAUAAUGAA	107
H44_41-62	GAUUAUAUCAUUUAUCAUA	87
H44_51-72	GUUAGCCACUGAUUAAUAUCU	88
H44_56-77	CUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	108
H44_61-82	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	89
H44_66-87	AACUGUUCAGCUUCUGUUAGCC	109
H44_71-92	UGAGAAACUGUUCAGCUUCUGU	90
H44_76-97	CUUUCUGAGAAACUGUUCAGCU	110
H44_81-102	UGUGUCUUUCUGAGAAACUGUU	91
H44_86-107	GAAUUUGUGUCUUUCUGAGAAA	111
H44_91-112	CUCAGGAAUUUGUGUCUUUCUG	112
H44_96-117	CAAUUCUCAGGAAUUUGUGUCU	113
H44_101-122	GUUCCCAAUUCUCAGGAAUUUG	92
H44_106-127	AGCAUGUCCCAAUUCUCAGGA	114
H44_111-132	UAUUUAGCAUGUCCCAAUUCU	93
H44_121-142	AUACCAUUUGUAUUUAGCAUGU	94
H44_62-81	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG	95

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del exón 45 (ejemplo de prueba 1).

5 Resultados experimentales

Los resultados son visibles en las FIG. 9 y 10. Estos experimentos revelaron que, cuando los oligómeros antisentido se diseñaron en los nucleótidos 11° al 32°, o del 26° al 47° del extremo 5' del exón 44 en el gen de la distrofina humana, la omisión del exón 44 de estos oligómeros antisentido se podría producir con la misma eficacia que la del oligómero antisentido que está diseñado en los nucleótidos 62° al 81° desde el extremo 5' del exón 44.

10 Ejemplo de prueba 7

Ensayo in vitro

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del exón 45 (ejemplo de prueba 2).

Resultados experimentales

15 Los resultados se muestran en la FIG. 11, 12 y 18. Este experimento reveló que en las células RD, los oligómeros PMO n° 24 y 26 (H44\_25-45 (OH) y H44\_27-47 (OH)) de la presente invención causaron la omisión del exón 44 con la misma eficacia que el oligómero antisentido PMO n° 30 (H44\_10-39 (OH)) (Figuras 11, 12). Se descubrió que el oligómero PMO n° 26 de la presente invención y el oligómero PMO n° 31 (H44\_27-46 (OH)), que es una base más corta que el oligómero PMO n° 26, causan la omisión del exón 44 con la misma eficiencia. (FIG. 18). Además, se descubrió que el oligómero PMO n° 26 de la presente invención causa la omisión del exón 44 con la misma eficacia

que el oligómero PMO nº 33 (H44\_27-47 (TEG)), que tiene una estructura final diferente del oligómero PMO nº 26 (FIG. 18).

Exon 50

- 5 De acuerdo con las descripciones en los ejemplos 30 a 39 a continuación, se sintetizaron varios tipos de PMO mostrados por los PMO nº 34-38 y 41-45 en la tabla 15. El PMO sintetizado se disolvió en agua para inyección (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). Los PMO nº 39 y 40 fueron adquiridos de Gene Tools, LLC.

Tabla 15

PMO nº	Nombre de secuencia	Nota	SEQ ID NO:
34	H50_103-123(OH)	extremo 5' : grupo (3)	96
35	H50_104-124(OH)	extremo 5' : grupo (3)	97
36	H50_105-125(OH)	extremo 5' : grupo (3)	98
37	H50_106-126(OH)	extremo 5' : grupo (3)	99
38	H50_107-127(OH)	extremo 5' : grupo (3) Secuencia correspondiente a la SEQ	100
39	H50_90-114(GT)	Secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 287 en el documento de patente 4, extremo 5': grupo (2)	101
40	H50_103-127(GT)	Secuencia correspondiente a la SEQ ID NO: 175 en el documento de patente 1, extremo 5' : grupo (2)	102
41	H50_107-126(OH)	extremo 5' : grupo (3)	119
42	H50_108-127(OH)	extremo 5' : grupo (3)	120
43	H50_108-128(OH)	extremo 5' : grupo (3)	121
44	H50_109-129(OH)	extremo 5' : grupo (3)	122
45	H50_107-127(TEG)	extremo 5' : grupo (1)	100

10 Ejemplo 30

PMO. Nº 34

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6861.8
	Observado: 6861.8

15

Ejemplo 31

PMO. Nº 35

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(6-benzamidedrino-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como material de partida.

20

ESI-TOF-MS	Calculado: 6885.8
	Observado: 6885.9

## Ejemplo 32

PMO. N° 36

- 5 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S,6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmolforin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6925.9
	Observado: 6925.9

## Ejemplo 33

- 10 PMO. N° 37

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S, 6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmolforin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6950.9
	Observado: 6950.9

- 15 Ejemplo 34

PMO. N° 38

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S, 6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmolforin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6990.9
	Observado: 6991.0

- 20

## Ejemplo 35

PMO. N° 41

- 25 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S, 6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmolforin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6635.6
	Observado: 6635.0

## Ejemplo 36

PMO. N° 42

- 30 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-[[[(2S, 6R)-6-[6-(2-cianoetoxi)-2-(2-fenoxiacetil)amino]purina-9-il]-4-tritilmolforin-2-il]metoxi]-4-oxo-butanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6635.6
	Observado: 6634.9

Ejemplo 37

PMO. N° 43

- 5 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S, 6R)-6-(5-metil-2,4-dioxo-3,4-dihidropirimidina-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6965.9
	Observado: 6965.2

Ejemplo 38

10 PMO. N° 44

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 4-(((2S,6R)-6-(6-benzamidapurina-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)-4-oxobutanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 6949.9
	Observado: 6949.2

15 Ejemplo 39

PMO. N° 45

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 1, excepto que se utilizó ácido 1,12-dioxo-1-(4-tritilpiperazin-1-il)-2,5,8,11-tetraoxa-15-pentadecanoico cargado sobre resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 5) como material de partida.

ESI-TOF-MS	Calculado: 7342.2
	Observado: 7341.6

20

Ejemplo de prueba 8

Ensayo in vitro

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del exón 45 (ejemplo de prueba 2), excepto que la RT-PCR se realizó utilizando los cebadores a continuación en las concentraciones de 0.1, 0.3 o 1 µM.

25 Cebador directo: 5'- AACAAACCGGATGTGGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 103)

Cebador inverso: 5'- TTGGAGATGGCAGTTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 104)

Resultados experimentales

30 Los resultados son visibles en las FIG. 13 y 19. Estos experimentos revelaron que en las células RD los oligómeros PMO n° 38 (H50\_107-127 (OH)) de la presente invención causaron la omisión del exón 50 con una mayor eficiencia que el oligómero antisentido PMO n° 39 o 40 (H50\_90- 114 (GT), H50\_103-127 (GT)). Además, los experimentos revelaron que el oligómero PMO n° 38 causó la omisión del exón 50 con una mayor eficacia que el oligómero PMO n° 45 (H50\_107-127 (TEG)), cuya estructura final es diferente de la del oligómero PMO n° 38 (FIG. 19).

Examen de omisión del exón 44

Ensayo in vitro utilizando fibroblastos humanos

35 Ejemplo de prueba 9

La actividad de omisión del exón 44 se determinó utilizando células GM05112 (fibroblastos obtenidos a partir de pacientes con DMD humana con delección del exón 45, Instituto Coriell de Investigación Médica). Como medio de crecimiento, se utilizó medio Eagle modificado de Dulbecco: mezcla de nutrientes F-12 (DMEM/F-12) (Invitrogen Corp.)

que contiene 10% de FCS y 1% de penicilina/estreptocina (P/S) (Sigma-Aldrich, Inc.) y las células se cultivaron en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

5 Las células se cultivaron en un matraz T225 y se añadieron 2.5 ml de retrovirus (coexpresión ZsGreen1) que expresaba MyoD obtenida a partir de humanos (SEQ ID NO: 38) y una concentración final de 8 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, Inc.) a 35 ml del medio de crecimiento. Después de la incubación a una temperatura de 32°C durante 2 días, el medio se cambió por un medio de crecimiento fresco y la incubación continuó a una temperatura de 37°C durante 3 días. Los fibroblastos transformados con MyoD positivo para ZsGreen1 se recolectaron mediante un clasificador de células BD FACSAria (BD Bioscience) y se colocaron en placas a 9x10<sup>4</sup> células/pocillo en una placa de 24 pocillos recubierta con colágeno. Al día siguiente, el medio fue reemplazado por un medio de diferenciación (DMEM/F-12 que contenía 2% de suero equino (Invitrogen Corp.), 1% de P/S y suplemento de medio líquido ITS (Sigma, Inc.)). El medio se cambió cada 2 a 3 días y se continuó la incubación para diferenciarse en miotubos.

15 El séptimo día después de cambiar el medio al medio de diferenciación, el medio fue reemplazado por un medio de diferenciación que contenía 6 µM a una concentración final de Endo-Porter (Gene Tools) y 1, 3, 10 µM de los oligómeros PMO n° 26 y 31 se añadieron a la misma a una concentración final. Después de que las células se incubaron durante 7 días, las células se recolectaron para extraer ARN total utilizando RNeasy Mini Kit (QIAGEN). La RT-PCR se realizó con 50 ng del ARN total extraído utilizando un kit QIAGEN OneStep RT-PCR. Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se utilizó un iCycler (fabricado por Bio-Rad) como un termociclador. El programa de RT-PCR utilizado es el siguiente.

20 50°C, 30 minutos: transcripción inversa

95°C, 15 minutos: desnaturalización térmica

[94°C, 1 minuto; 60°C, 1 minutos; 72°C, 1mins]x35 ciclos: amplificación por PCR

72°C, 7 minutos: reacción de extensión final

Las secuencias de nucleótidos del cebador directo y el cebador inverso utilizados para RT-PCR se dan a continuación.

25 Cebador directo: 5'- GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (SEQ ID NO: 36)

Cebador inverso: 5'- GGGCAACTCTCCACCAGTA-3' (SEQ ID NO: 37)

30 El producto de reacción de RT-PCR anterior se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2% y las imágenes en gel se capturaron con un analizador de imágenes ImageQuant LAS 4000 mini (fabricado por FUJI Film). Utilizando el software adjunto, se midió el nivel de polinucleótido "A" de la banda con omisión del exón 44 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin omisión del exón 44. En base a estos valores de medición de "A" y "B", la eficacia de omisión se determinó mediante la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

35 El resultado se muestra en la FIG. 20. Estos experimentos revelaron que en las células GM05112 los oligómeros PMO n° 26 y 31 de la presente invención causaron la omisión del exón 44 con una alta eficacia.

Ejemplo de prueba 10

40 Se prepararon fibroblastos transformados con MyoD utilizando células GM05112 de acuerdo con el procedimiento del ejemplo de prueba 9, y las células se diferenciaron en miotubos. Posteriormente, el medio de diferenciación fue reemplazado por un medio de diferenciación que contenía 6 µM a una concentración final de Endo-Porter (Gene Tools), y los oligómeros PMO N° 26 y 31 se añadieron a las células a una concentración final de 10 µM en el 6° día después de que el medio fue cambiado al medio de diferenciación. Después de la incubación durante 14 días, las células se recolectaron mediante un raspador utilizando un tampón de lisis celular RIPA (fabricado por Pierce) que contiene un cóctel inhibidor de la proteasa Complete Mini (fabricado por Roche). El lisado celular se extrajo de las células alterando las células mediante una trituradora ultrasónica Bioruptor UCD-250 (Tosho Denki) y recolectando el sobrenadante después de la centrifugación. Las concentraciones de proteína se cuantificaron utilizando un kit de ensayo de proteína BCA Pierce (Pierce). La absorbancia de 544 nm de longitud de onda se detectó utilizando un lector de placas Thermo Appliskan Type2001 (Thermo Electron).

50 Los 3 µg de lisados celulares se sometieron a electroforesis en gel de acrilamida NuPAGE Novex Tris-Acetate Gel 3-8% (fabricado por Invitrogen) y se transfirieron a una membrana Immobilon-P (fabricada por Millipore) utilizando un papel secante semiseco. La membrana transferida se lavó con PBS (PBST) que contenía 0.1% de Tween20 y se bloqueó con PBST que contenía 5% de agente de bloqueo Amersham ECL Prime (GE Healthcare) en el refrigerador durante la noche. Después de lavar la membrana con PBST, la membrana se incubó en una solución de anticuerpo anti-distrofina (fabricado por NCL-Dys1, Novocastra) diluido 50 veces con Can Get Signal1 (fabricado por TOYOBO) a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con PBST, la membrana se incubó en una solución de

5 anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra conjugado con peroxidasa (170-6516, Bio-Rad) diluido 2500 veces con Can Get Signal1 (fabricado por TOYOBO) a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de lavar con PBST, la membrana se tiñó con un sistema de detección de transferencia Western ECL Plus (GE Healthcare). La quimioluminiscencia de la proteína distrofina eliminada del exón 44-45 se detectó mediante el analizador de imagen lumino ImageQuant LAS 4000 mini (película FUJI).

#### Resultados experimentales

10 Los resultados de la transferencia Western se muestran en la FIG. 21. En la FIG. 21, la punta de flecha representa una banda de proteína distrofina de la cual se confirmó la expresión. Este experimento revela que los oligómeros PMO nº 26 y 31 de la presente invención indujeron la expresión de proteínas de distrofina en células GM05112.

#### Estudio de la omisión del exón 50

##### Ensayo in vitro utilizando fibroblastos humanos

##### Ejemplo de prueba 11

15 Los fibroblastos transformados con MyoD se prepararon utilizando células GM05112 para diferenciarse en miotubos de acuerdo con el procedimiento del ejemplo de prueba 9.

20 Posteriormente, el medio de diferenciación se reemplazó por un medio de diferenciación que contenía 6 µM de Endo-Porter (Gene Tools), y se añadió un oligómero PMO nº 38 al mismo a una concentración final de 0.1, 0.3, 1, 3, 10 µM en el día 12 después de que el medio fue cambiado al medio de diferenciación. Después de la incubación durante 2 días, se recolectaron las células. El ARN total se extrajo de las células, se realizó RT-PCR y se determinó la eficacia de omisión de acuerdo con el procedimiento del ejemplo de prueba 9, excepto que las secuencias de nucleótidos del cebador directo y el cebador inverso que se proporcionan a continuación se utilizaron para RT-PCR.

Cebador directo: 5'- AACAAACCGGATGTGGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 103)

Cebador inverso: 5'- TTGGAGATGGCAGTTTCCTT-3' (SEQ ID NO: 104)

#### Resultados experimentales

25 El resultado de RT-PCR se muestra en la FIG. 22 y el resultado de la eficiencia de omisión se muestra en la FIG. 23. Estos experimentos revelaron que en las células GM05112 el oligómero PMO nº 38 de la presente invención causó la omisión del exón 50 con una alta eficiencia y el valor de EC<sub>50</sub> fue de 1.3 µM.

##### Ejemplo de prueba 12

30 Los experimentos para la omisión se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del ejemplo de prueba 11, excepto que 11-0627 células (fibroblastos obtenidos a partir de pacientes con DMD humana con duplicación de exones 8-9, depósito de recursos de investigación del trastorno neuromuscular del Centro Nacional de Neurología y Psiquiatría) se utilizaron y se añadió el oligómero PMO nº 38 a una concentración final de 0.1, 1, 10 µM.

#### Resultados experimentales

35 El resultado de RT-PCR se muestra en la FIG. 26 y la eficacia de emisión se muestra en la FIG. 27. Estos experimentos revelaron que en las células 11-0627 el oligómero PMO nº 38 de la presente invención causó la omisión del exón 50 con una alta eficacia.

##### Ejemplo de prueba 13

##### Preparación del lentivirus pLVX-MyoD-ZsGreen1

40 El pLVZ-puro (8120 pb, Clontech) se linearizó eliminando 1164 pb de nucleótidos que se encuentran del sitio XhoI, en el sitio multiclonado (en 2816), al sitio (en 3890) adyacente al extremo 3' de la región codificante del gen resistente a Puromicina para preparar un vector linearizado. Posteriormente, las secuencias de nucleótidos (2272 pb) que codifican el gen MyoD humano, la secuencia IRES, el gen ZsGreen1 se integraron a su vez en el vector linearizado y después se preparó el vector de expresión de lentivirus pLVX-MyoD-ZsGreen1 (9210 pb).

45 Las células Lenti-X 293T se sembraron en placas recubiertas con colágeno de 10 cm de acuerdo con el protocolo adjunto al sistema de envasado Lenti-X HTX (Clontech). El vector de expresión de lentivirus y el vector de empaquetamiento se transfectaron en fibroblastos tres días antes de la infección. Después de cuatro horas, se intercambié el medio y las células se incubaron durante tres días sin intercambiar medio. El día de la infección, el sobrenadante del cultivo se recolectó como una solución de virus (aproximadamente 9 ml para una placa de 10 cm). El sobrenadante de cultivo se filtró mediante un cellstrain (40 µm) y después se centrifugó por 500 × g, 10 min. Este sobrenadante se concentró de acuerdo con el protocolo adjunto al Concentrador Lenti-X (Clontech) y después se

50

disolvió en medio DMEM/F12 hasta diez veces la concentración del sobrenadante de cultivo recolectado. Esta solución se utilizó como una solución de virus.

Infección por virus en fibroblastos

- 5 Las células GM04364 (fibroblastos obtenidos a partir de pacientes con DMD humana con delección de los exones 51-55, Instituto Coriell de Investigación Médica) se colocaron en placas en una placa de 24 pocillos recubierta de colágeno por  $3 \times 10^4$ /pocillo el día de la infección. El día de la infección, se añadieron 400  $\mu$ l del medio de diferenciación, 100  $\mu$ l de la solución de virus y 8  $\mu$ g/ml de polibreno a una concentración final por pocillo. El día después de la infección, el medio que contenía el virus se intercambi6 por 500  $\mu$ l del medio de diferenciación. El medio de diferenciación se intercambi6 cada 2 o 3 días y las células se incubaron durante 12 días para inducir la diferenciación en miotubos.

- 10 En el día 12 después de que el medio se intercambi6 en el medio de diferenciación, el medio se reemplaz6 por un medio de diferenciación que contenía 6  $\mu$ M Endo-Porter (Gene Tools) a una concentración final y se añadieron 0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu$ M del olig6mero PMO n°38 al mismo a una concentración final. Después de la incubación durante 2 días, se recolectaron las células. La eficacia de omisión se determin6 de acuerdo con el procedimiento del ejemplo de prueba 11, excepto que las secuencias de nucle6tidos del cebador directo y el cebador inverso dados a continuación se utilizaron para RT-PCR.

Cebador directo: 5'- AACAAACCGGATGTGGAAGAG-3' (SEQ ID NO: 103)

Cebador inverso: 5'- CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3' (SEQ ID NO: 70)

Resultados experimentales

- 20 El resultado de RT-PCR se muestra en la FIG. 28 y la eficacia de omisión se muestra en la FIG. 29. Estos experimentos revelaron que en las células GM04364 el olig6mero PMO n°38 de la presente invención caus6 la omisión del ex6n 50 con una alta eficacia.

Estudio de la omisión del ex6n 55

Ensayo in vitro utilizando fibroblastos humanos

- 25 Ejemplo de prueba 14

Los experimentos se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del ejemplo de prueba 11, excepto que se utilizaron los olig6meros PMO n° 14 y 21 y la RT-PCR se realiz6 utilizando los cebadores siguientes.

Cebador directo: 5'- CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3' (SEQ ID NO: 69)

Cebador inverso: 5'- CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3' (SEQ ID NO: 70)

- 30 Resultados experimentales

El resultado de RT-PCR se muestra en la FIG. 24 y la eficacia de omisión se muestra en la FIG. 25. Estos experimentos revelaron que en las células GM05112 los olig6meros PMO n° 14 y 21 de la presente invención causaron la omisión del ex6n 55 con una alta eficacia y el valor de EC<sub>50</sub> fue de 3.5  $\mu$ M y 7.5  $\mu$ M, respectivamente.

Ejemplo de prueba 15

- 35 Los experimentos se realizaron de acuerdo con la condición y el procedimiento del ejemplo de prueba 13, excepto que se utilizaron las células 04-035 (células obtenidas a partir de pacientes con DMD humana con delección única del ex6n 54, dep6sito de recursos de investigación del trastorno neuromuscular del Centro Nacional de Neurología y Psiquiatría) y se añadieron 1, 3, 10  $\mu$ M de los olig6meros PMO n° 14 y 21 a una concentración final y la RT-PCR utilizando los cebadores siguientes.

- 40 Cebador directo: 5'- CATGGAAGGAGGGTCCCTAT-3' (SEQ ID NO: 69)

Cebador inverso: 5'- CTGCCGGCTTAATTCATCAT-3' (SEQ ID NO: 70)

Resultados experimentales

- 45 El resultado de RT-PCR se muestra en la FIG. 30 y la eficacia de omisión se muestra en la FIG. 31. Estos experimentos revelaron que en células obtenidas a partir de pacientes con DMD humana con delección única del ex6n 54, los olig6meros PMO n° 14 y 21 de la presente invención causaron la omisión del ex6n 55 con una alta eficacia.

Aplicabilidad industrial

Los resultados experimentales en los ejemplos de prueba demuestran que los oligómeros de la presente invención causaron la omisión del exón con una eficacia notablemente alta tanto en células RD como en células obtenidas a partir de pacientes con DMD.

5 Por lo tanto, los oligómeros de la presente invención son extremadamente útiles para el tratamiento de DMD.

Listado de secuencias de texto libre

SEQ ID NO: 9: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 10: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 11: ácido nucleico sintético

10 SEQ ID NO: 12: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 13: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 14: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 15: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 16: ácido nucleico sintético

15 SEQ ID NO: 17: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 18: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 19: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 20: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 21: ácido nucleico sintético

20 SEQ ID NO: 22: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 23: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 24: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 25: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 26: ácido nucleico sintético

25 SEQ ID NO: 27: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 28: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 29: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 30: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 31: ácido nucleico sintético

30 SEQ ID NO: 32: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 33: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 34: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 35: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 36: ácido nucleico sintético

35 SEQ ID NO: 37: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 38: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 39: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 40: ácido nucleico sintético

- SEQ ID NO: 41: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 42: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 43: ácido nucleico sintético
- 5 SEQ ID NO: 45: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 46: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 47: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 48: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 49: ácido nucleico sintético
- 10 SEQ ID NO: 50: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 51: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 52: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 53: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 54: ácido nucleico sintético
- 15 SEQ ID NO: 55: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 56: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 57: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 58: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 59: ácido nucleico sintético
- 20 SEQ ID NO: 60: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 61: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 62: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 63: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 64: ácido nucleico sintético
- 25 SEQ ID NO: 65: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 66: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 67: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 68: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 69: ácido nucleico sintético
- 30 SEQ ID NO: 70: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 71: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 72: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 73: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 74: ácido nucleico sintético
- 35 SEQ ID NO: 75: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 76: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 77: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 78: ácido nucleico sintético

- SEQ ID NO: 79: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 80: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 81: ácido nucleico sintético
- 5 SEQ ID NO: 82: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 83: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 84: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 85: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 86: ácido nucleico sintético
- 10 SEQ ID NO: 87: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 88: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 89: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 90: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 91: ácido nucleico sintético
- 15 SEQ ID NO: 92: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 93: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 94: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 95: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 96: ácido nucleico sintético
- 20 SEQ ID NO: 97: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 98: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 99: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 100: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 101: ácido nucleico sintético
- 25 SEQ ID NO: 102: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 103: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 104: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 105: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 106: ácido nucleico sintético
- 30 SEQ ID NO: 107: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 108: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 109: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 110: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 111: ácido nucleico sintético
- 35 SEQ ID NO: 112: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 113: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 114: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 115: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 116: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 117: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 118: ácido nucleico sintético

5 SEQ ID NO: 119: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 120: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 121: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 122: ácido nucleico sintético

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> NIPPON SHINYAKU CO., LTD. NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY	
	<120> ÁCIDO NUCLEICO ANTISENTIDO	
10	<130> PCT12-0051	
	<150> JP 2011-288040 <151> 28-12-2011	
15	<150> JP 2012-043092 <151> 29-02-2012	
	<160> 122	
20	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1 <211> 192 <212> ADN <213> Homo sapiens	
25	<400> 1	
	agggtgagtg agcgagagge tgctttggaa gaaactcata gattactgca acagttcccc	60
	ctggacctgg aaaagtttct tgccctggctt acagaagctg aaacaactgc caatgtccia	120
	caggatgcta cccgtaagga aaggtccia gaagacicca agggagtaaa agagctgatg	180
	aaacaatgga aa	192
30	<210> 2 <211> 179 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 2	
	caggaactcc aggatggcat tgggcagcgg caaactgttg tcagaacatt gaatgcaact	60
	ggggaagaaa taaticagca atcctcaaaa acagatgcca gtattctaca ggaaaaatig	120
35	ggaagcctga atctgcggig gcaggaggtc tgcaaacagc tgtcagacag aaaaaagag	179
40	<210> 3 <211> 129 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 3	
	aggaagitag aagatctgag ctctgagtgg aaggcggtaa accgtttact tcaagactg	60
	agggcaaagc agcctgacct agctcctgga ctgaccacta ttggagcctg taagtatact	120
	ggatcccat	129
45	<210> 4	

ES 2 748 868 T3

	<211> 148	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 4	
	gcgatttgac agatctgttg agaaatggcg gcgttttcat tatgatataa agatatttaa	60
	tcagiggcta acagaagctg aacagtttct cagaagaca caaatctctg agaattggga	120
	acaatgctaaa tacaaatggt atcttaag	148
10	<210> 5	
	<211> 192	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
	ttgccattgt ttcacagct cttttactcc ctggagctc tctaggagcc tttctttag	60
	ggtagcatcc tgtaggacat tggcagttgt ttcagcttct gtaagccagg caagaaactt	120
	ttccaggctc agggggaact gttgcagtaa tctatgagtt tcttccaaag cagcctctcg	180
15	ctcactcacc ct	192
20	<210> 6	
	<211> 179	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 6	
	ctcttttttc tgtctgacag ctgtttgcag acctctgcc accgcagatt cagcttccc	60
	aatttttct gtagaatact ggcactcgtt ttgaggatt gctgaattat ttttcecca	120
25	gttgcattca atgttctgac aacagtttgc cgttgcctaa tgccatctg gagttctg	179
30	<210> 7	
	<211> 129	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	
	atgggatcca gtatacttac agctccaat agtggtcagt ccaggagcta ggtcaggctg	60
	cttggccctc agctctttaa gtaaacgggt taccgccttc cactcagagc tcagatcttc	120
	taacttct	129
35	<210> 8	
	<211> 148	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 8	
	cttaagatac catttgtatt tagcatgttc ccaattctca ggaatttgtg tctttctgag	60
	aaactgttca gcttctgtta gccactgatt aaatattctt atatcataat gaaaacgccg	120
	ccatttctca acagatctgt caaatcgc	148

5 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 9  
 caatgccatc ctggagtcc t 21  
  
 15 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 10  
 ccaatgccat cctggagttc c 21  
  
 25 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 11  
 cccaatgccca tcctggagtt c 21  
  
 35 <210> 12  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 12  
 gcccaatgcc atcctggagt t 21  
  
 45 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 13  
 tgccaatgc catcctggag t 21  
  
 55 <210> 14  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 14  
 cccaatgccca tcctggagtt cctgt 25

5 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 15  
 cagttgccg ctgccaatg ccatcctgga 30  
  
 15 <210> 16  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 16  
 ccaatgccat cctggagttc 20  
  
 25 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 17  
 cccaatgccca tcctggagtt 20  
  
 35 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 18  
 cccaatgccca tcctggagtt c 21  
  
 45 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 19  
 gcugcccaau gccauccugg aguuc 25  
  
 55 <210> 20  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 20  
 uugccgcugc ccaaugccau ccugg 25  
  
 65

5 <210> 21  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 21  
 acaguuugcc gcugccaau gccau 25  
  
 15 <210> 22  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 22  
 ugacaacagu uugccgcugc ccaau 25  
  
 25 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 23  
 uguucugaca acaguuugcc gcugc 25  
  
 35 <210> 24  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 24  
 uucaauguuc ugacaacagu uugcc 25  
  
 45 <210> 25  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 25  
 uugcauucaa uguucugaca acagu 25  
  
 60 <210> 26  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 65 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 26  
 cccaguugca uucaauguuc ugaca 25

5 <210> 27  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 27  
 ucuuccccag uugcaucaa uguuc 25  
  
 15 <210> 28  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 28  
 uuauuucuuc cccaguugca uucaa 25  
  
 25 <210> 29  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 29  
 cugaauuauu ucuuccccag uugca 25  
  
 35 <210> 30  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 30  
 gauugcugaa uuauuucuuc cccag 25  
  
 45 <210> 31  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 31  
 uugaggauug cugaauuauu ucuuc 25  
  
 55 <210> 32  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 32  
 uguuuuugag gauugcugaa uuauu 25  
  
 65

5 <210> 33  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 33  
 gcaucuguuu uugaggauug cugaa 25

15 <210> 34  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 34  
 uacuggcauc uguuuuugag gauug 25

25 <210> 35  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 35  
 uuugccgcug cccaaugcca uccug 25

35 <210> 36  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético

45 <400> 36  
 gctcaggtcg gattgacatt 20

50 <210> 37  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Ácido nucleico sintético

55 <400> 37  
 gggcaactct tccaccagta 20

60 <210> 38  
 <211> 963  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 38

ES 2 748 868 T3

atggagctac tgcgccacc gctcccgac gtagacctga cggeccccga cggctctctc 60  
 tgcctcttgg ccacaacgga cgacttctat gacgacctgt gtttcgactc cccggacctg 120  
 cgcctctctg aagacctgga cccgcgctg atgcacgtgg ggcgctctct gaaacctgaa 180  
 gagcactcgc acttccccgc ggcggtgcac ccggccccgg ggcacacgtga ggacgagcat 240  
 gtcgctcgc ccagcgggca ccaccaggcg ggccgctgcc tactgtgggc ctgcaaggcg 300  
 tgcaagcgca agaccaccaa cgccgaccgc cgcaaggccg ccaccatgcg cgagcggcgc 360  
 cgcctgagca aagtaaatga ggctttgag acaactcaagc gctgcacgtc gagcaatcca 420  
 aaccagcggg tgcceaaggt ggagatccig cgcaacgcca tccgctatat cgagggcctg 480  
 caggctctgc tgcgcgacca ggaccccgcg cccctggcg ccgcagccgc cttctatgcg 540  
 ccggccccgc tgcctccggg ccgcggcggc gagcactaca ggcgagactc cgacgcgtcc 600  
 agcccgcgct ccaactgctc cgacggcatg atggactaca gcggcccccc gagcggcgcc 660  
 cggcggcgga actgctacga aggcgcttac tacaacgagg cgcccagcga acccaggccc 720  
 gggaagagtg cggcgggtgc gagcctagac tgccctgcca gcatcgtgga ggcctctcc 780  
 accgagagcc ctgcggcgcc cgcctctctg ctggcgagc tgcctctgta gtcgctccg 840  
 cgcaggcaag aggcctcgc ccccgagcag ggagagagca gcggcgacct caccagctca 900  
 ccggacgccc ccccgagctg cctcgggggt gcgaacccca acccgatata ccaggctctc 960  
 tga 963

5

<210> 39  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> Ácido nucleico sintético

15

<400> 39  
 cctgagaatt gggaacatgc 20

<210> 40  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> Ácido nucleico sintético

25

<400> 40  
 ttgctgctct ttccaggtt 20

<210> 41  
 <211> 21  
 <212> ADN

30

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 41  
 agcagcctct cgctcactca c 21  
 10 <210> 42  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 42  
 20 ttcaaagca gcctctcgct c 21  
 <210> 43  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 43  
 30 ttctcaaaa gcagcctctc g 21  
 <210> 44  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 44  
 agtttctcc aaagcagcct c 21  
 <210> 45  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 45  
 ttcttcaa agcagcctct c 21  
 <210> 46  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 46  
 gtttctcca aagcagcctc t 21  
 65 <210> 47  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 47  
 gagtttcttc caaagcagcc t 21  
 10 <210> 48  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 48  
 tgagtttctt ccaagcagc c 21  
 20 <210> 49  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 49  
 30 gcagccucuc gcucacucac c 21  
 <210> 50  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 50  
 ccaaagcagc cucucgcuca c 21  
 <210> 51  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 51  
 uucuuccaaa gcagccucuc g 21  
 <210> 52  
 55 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 52  
 aucuaugagu uucuuccaaa g 21  
 65 <210> 53  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 53  
 uguugcagua aucuaugagu u 21  
 10 <210> 54  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 54  
 20 cagggggaac uguugcagua a 21  
 <210> 55  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 55  
 30 uuuccagguc cagggggaac u 21  
 <210> 56  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 56  
 gcaagaaacu uuuccagguc c 21  
 <210> 57  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 57  
 uguaagccag gcaagaaacu u 21  
 <210> 58  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 58  
 uuucagcuuc uguaagccag g 21  
 65 <210> 59  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 59  
 uuggcaguug uuucagcuuc u 21  
 10 <210> 60  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 60  
 20 cuguaggaca uuggcaguug u 21  
 <210> 61  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 61  
 30 gguagcauc cuguaggaca u 21  
 <210> 62  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 62  
 40 cuuuccuac gguagcauc c 21  
 <210> 63  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 63  
 50 uucuaggagc cuuuccuac g 21  
 <210> 64  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 64  
 ccuuggaguc uucuaggagc c 21  
 65 <210> 65  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 65  
 uuuuuuacuc ccuuggaguc u 21  
 10 <210> 66  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 66  
 uuucaucagc uuuuuuacuc c 21  
 20 <210> 67  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 67  
 30 uugccauugu uucaucagcu 20  
 <210> 68  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 68  
 uccuguagga cauuggcagu 20  
 <210> 69  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 69  
 catggaagga gggccctat 20  
 <210> 70  
 <211> 20  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 70  
 ctgccggctt aattcatcat 20  
 65 <210> 71  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 71  
 ataataaaaa cgccgcatt t 21  
 10 <210> 72  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 72  
 tcataatgaa aacgcccga t 21  
 20 <210> 73  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 73  
 30 atcataatga aaacgccc a 21  
 <210> 74  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 74  
 tatcataatg aaaacgccc c 21  
 <210> 75  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 75  
 atatcataat gaaaacgccc c 21  
 <210> 76  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 60 <400> 76  
 tatatcataa tgaaaacgcc g 21  
 65 <210> 77  
 <211> 21  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 77  
 ttatatcata atgaaaacgc c 21  
 10 <210> 78  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 78  
 20 tgaaaacgcc gccattctc aacagatctg 30  
 <210> 79  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 79  
 30 atcataatga aaacgccgcc 20  
 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 80  
 tatcataatg aaaacgccgc 20  
 <210> 81  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 81  
 tatcataatg aaaacgccgc c 21  
 <210> 82  
 <211> 22  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 82  
 65 cucaacagau cugucaaauc.gc 22  
 <210> 83  
 <211> 22  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 83  
 gccgccauuu cucaacagau cu 22  
 10 <210> 84  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 84  
 uaaugaaaac gccgccauuu cu 22  
 20 <210> 85  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 85  
 30 uaucauaaug aaaacgccgc ca 22  
 <210> 86  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 86  
 cuuuauauca uaaugaaaac gc 22  
 <210> 87  
 <211> 22  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 87  
 gauuaaaau cuuuauauca ua 22  
 <210> 88  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 60 <400> 88  
 guuagccacu gauuaaaau cu 22  
 65 <210> 89  
 <211> 22  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 89  
 uucagcuucu guuagccacu ga 22  
 10 <210> 90  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 90  
 20 ugagaaacug uucagcuucu gu 22  
 <210> 91  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 91  
 30 ugugucuuuc ugagaaacug uu 22  
 <210> 92  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 92  
 guucccaauu cucaggaauu ug 22  
 <210> 93  
 <211> 22  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 93  
 uauuuagcau guucccaauu cu 22  
 <210> 94  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 60 <400> 94  
 auaccuuug uauuuagcau gu 22  
 65 <210> 95  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 95  
 ucagcuucug uuagccacug 20  
 10 <210> 96  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 96  
 tccagtatac ttacaggctc c 21  
 20 <210> 97  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 97  
 30 atccagtata cttacaggct c 21  
 <210> 98  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 98  
 gatccagtat acttacaggc t 21  
 <210> 99  
 <211> 21  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 99  
 ggatccagta tacttacagg c 21  
 <210> 100  
 55 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 100  
 gggatccagt atacttacag g 21  
 65 <210> 101  
 <211> 25  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 101  
 cttacaggct ccaatagtgg tcagt 25  
 10 <210> 102  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 102  
 20 gggatccagt atacttacag gctcc 25  
 <210> 103  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 103  
 30 aacaaccgga tgtggaagag 20  
 <210> 104  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 104  
 ttggagatgg cagtttcctt 20  
 <210> 105  
 <211> 22  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 105  
 cauuucuaa cagaucuguc aa 22  
 <210> 106  
 <211> 22  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 106  
 aaaacgccgc cauuucuaa ca 22  
 65 <210> 107  
 <211> 22  
 <212> ADN

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 107  
 aauaucuuua uaucuaaag aa 22  
 10 <210> 108  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 108  
 cuucuguuag ccacugauua aa 22  
 20 <210> 109  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 109  
 30 aacuguucag cuucuguuag cc 22  
 <210> 110  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 110  
 40 cuuucugaga aacuguucag cu 22  
 <210> 111  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 45 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 111  
 50 gaauuugugu cuuucugaga aa 22  
 <210> 112  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 55 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 112  
 60 cucaggaauu ugugucuuc ug 22  
 <210> 113  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 65

<213> Artificial  
 <220>  
 5 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 113  
 caauucucag gaauugugu cu 22  
 10 <210> 114  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 114  
 20 agcauguucc caauucucag ga 22  
 <210> 115  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 115  
 30 gagtcttcta ggagcctt 18  
 <210> 116  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 35 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 40 <400> 116  
 gtttctcca aagcagcctc 20  
 <210> 117  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Ácido nucleico sintético  
 50 <400> 117  
 agtttctcc aaagcagcct 20  
 <210> 118  
 <211> 21  
 55 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 60 <223> Ácido nucleico sintético  
 <400> 118  
 agtttctcc aaagcagcct c 21  
 65 <210> 119  
 <211> 20  
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 119  
ggatccagta tacttacagg 20

10 <210> 120  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

15 <220>  
<223> Ácido nucleico sintético

<400> 120  
gggatccagt atacttacag 20

20 <210> 121  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

25 <220>  
<223> Ácido nucleico sintético

<400> 121  
30 tgggatccag tatacttaca g 21

<210> 122  
<211> 21  
<212> ADN

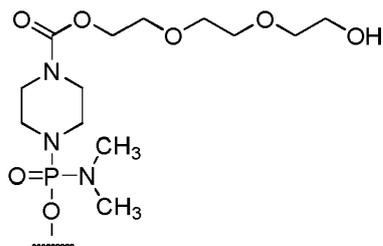
35 <213> Artificial

<220>  
<223> Ácido nucleico sintético

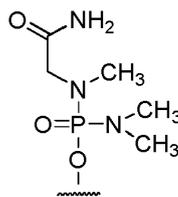
40 <400> 122  
atgggatcca gtacttac a 21

## REIVINDICACIONES

1. Un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 55° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos del 14° al 34° o del 15° al 34°, desde el extremo 5' del exón 55° en el gen de la distrofina humana.
2. El oligómero antisentido de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos del 157° al 177° y del 157° al 176° de la SEQ ID NO: 5.
3. Un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 45° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 1° al 21°, desde el extremo 5' del exón 45° en el gen de la distrofina humana.
4. El oligómero antisentido de la reivindicación 3, que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 156° al 176° de la SEQ ID NO: 6.
5. Un oligómero antisentido que provoca la omisión del exón 50° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 107° al 127°, desde el extremo 5' del exón 50° en el gen de la distrofina humana.
6. El oligómero antisentido de la reivindicación 5, que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 3° al 23° de la SEQ ID NO: 7.
7. Un oligómero antisentido que causa la omisión del exón 44° en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia complementaria a las secuencias de nucleótidos que consisten en los nucleótidos 27° al 47° o 27° al 46°, desde el extremo 5' del exón 44° en el gen de la distrofina humana.
8. El oligómero antisentido de la reivindicación 7, que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 102° al 122° y 103° al 122° de la SEQ ID NO: 8.
9. El oligómero antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es un oligonucleótido.
10. El oligómero antisentido según la reivindicación 9, en donde el resto de azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido está modificada.
11. El oligómero antisentido según la reivindicación 10, 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 está reemplazado por uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH<sub>2</sub>, NHR, NR<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, CN, F, Cl, Br e I en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquileo.
12. El oligómero antisentido según la reivindicación 10 u 11, en donde la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace de boranofosfato.
13. El oligómero antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que es un oligómero de morfolino.
14. El oligómero antisentido según la reivindicación 13, que es un oligómero de morfolino fosfordiamidato.
15. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, en donde el extremo 5' es cualquiera de los grupos de fórmulas químicas (1) a (3) a continuación:



( 1 )



( 2 )



( 3 )

16. Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como ingrediente activo el oligómero antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Figura 1

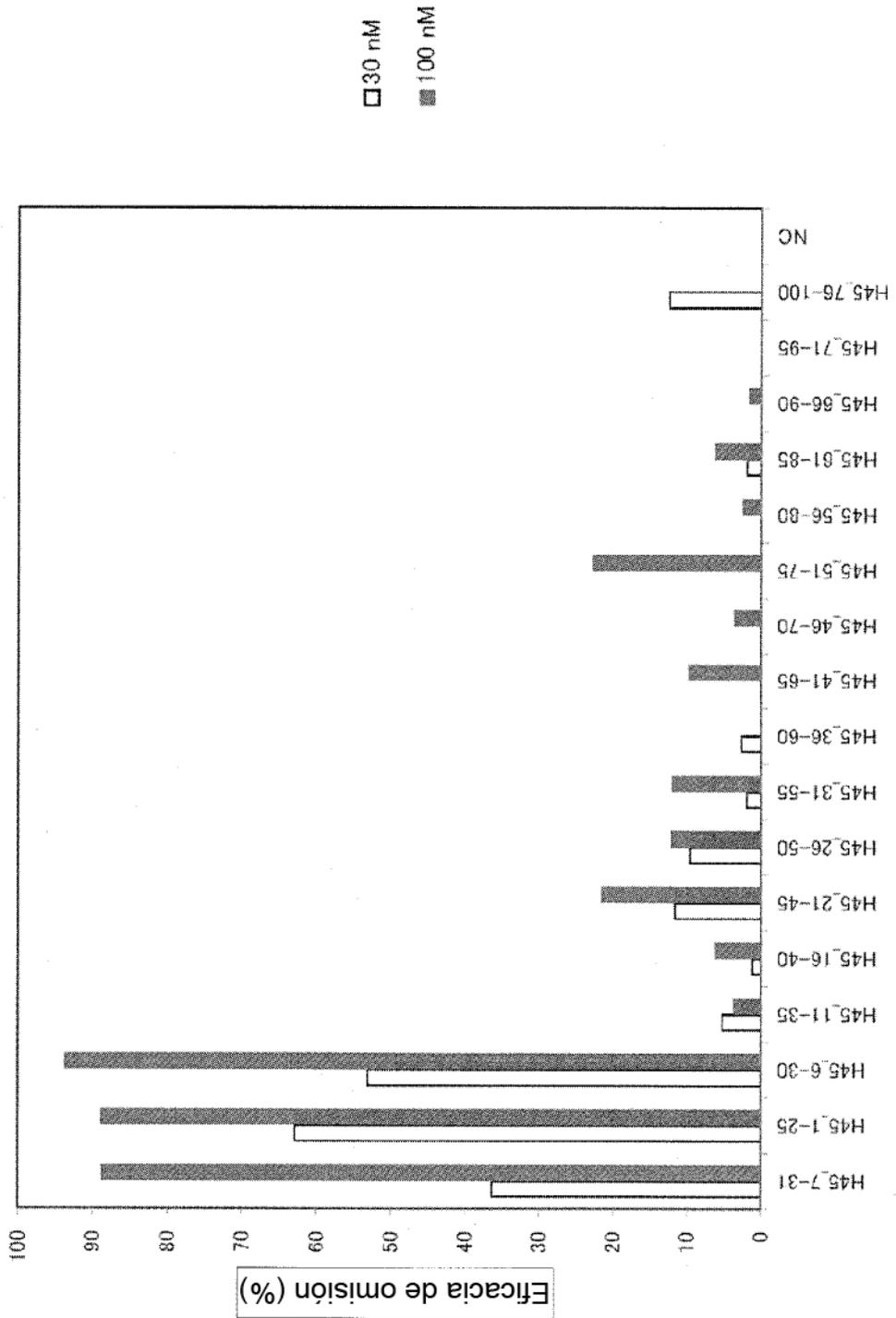


Figura 2

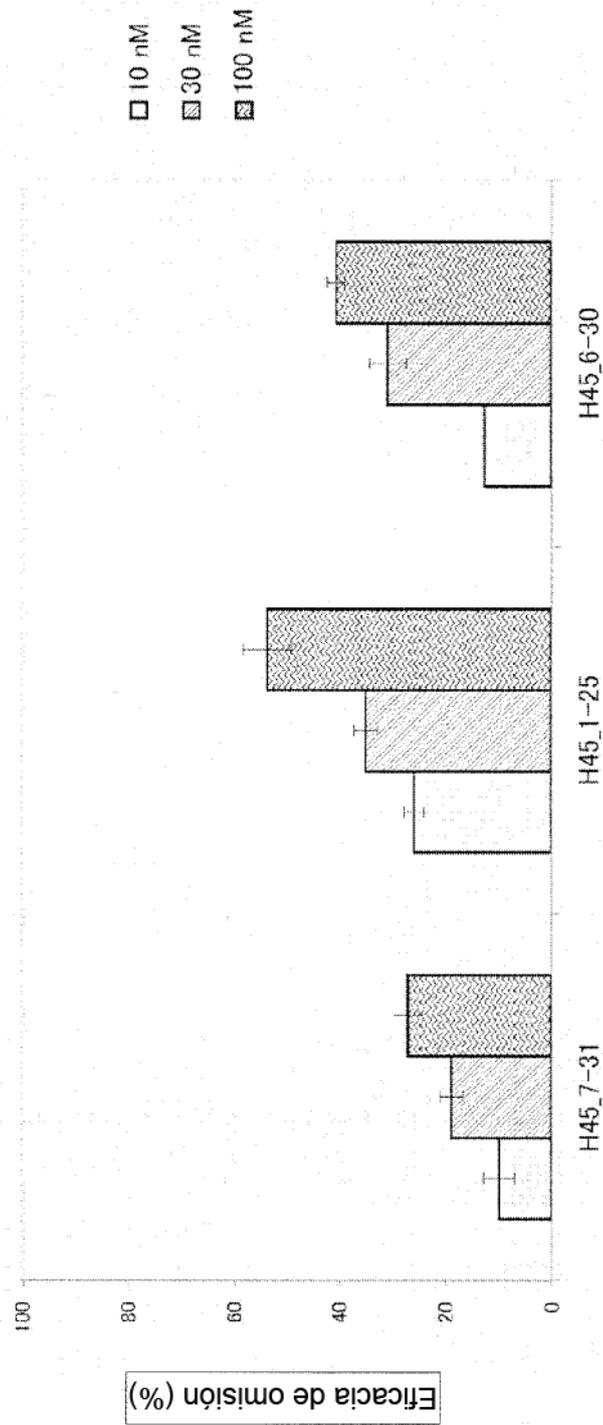


Figura 3

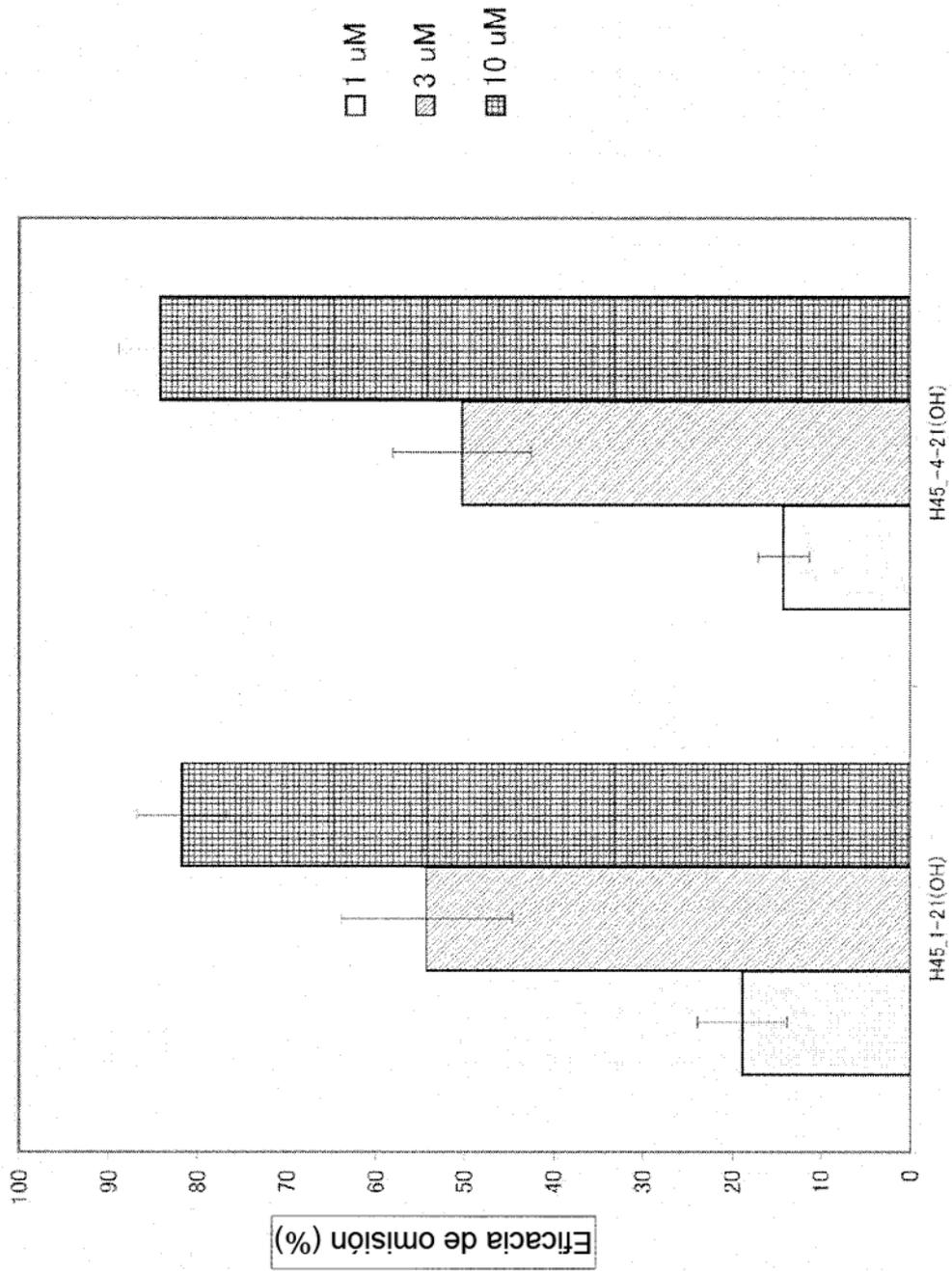


Figura 4

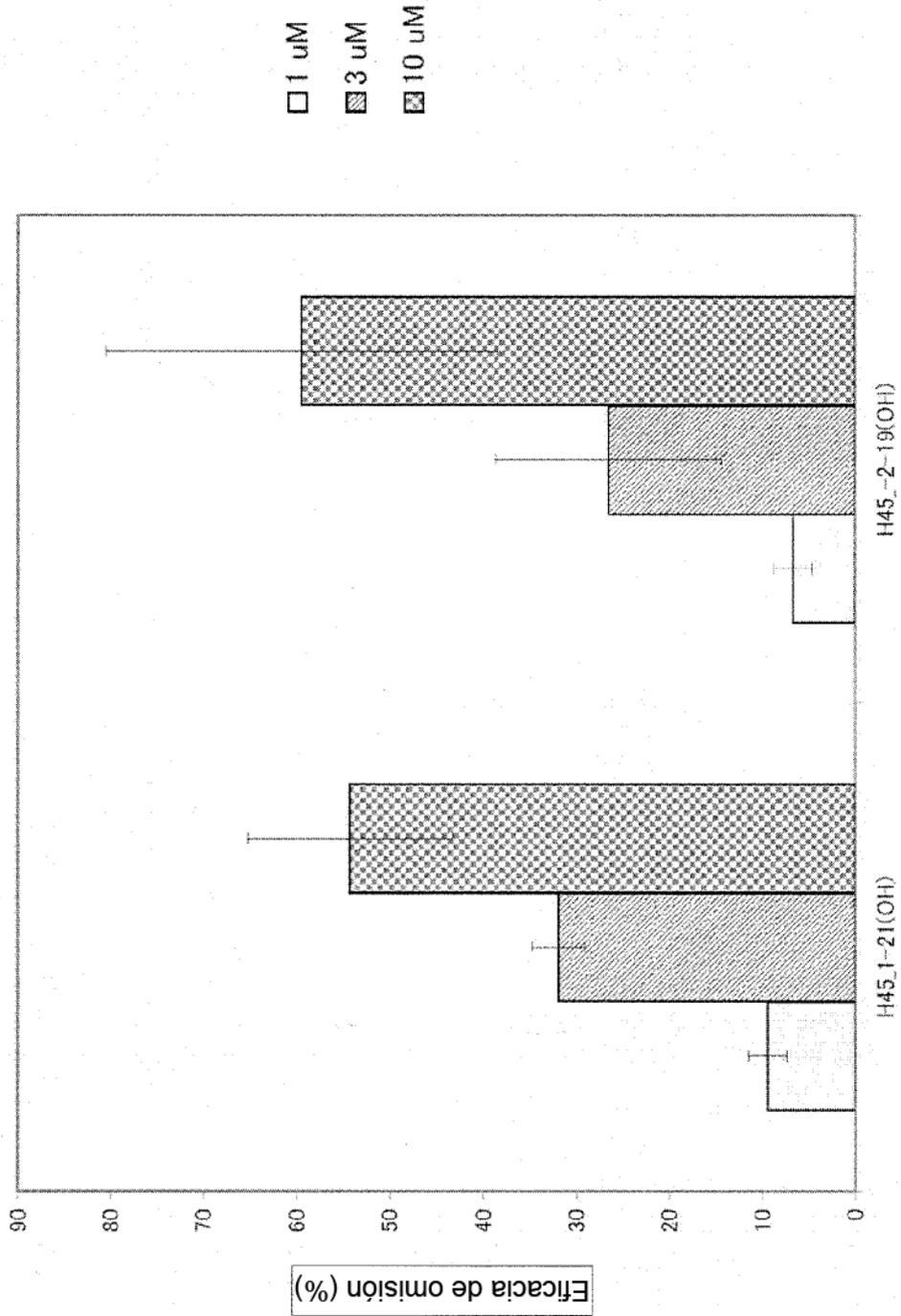


Figura 5

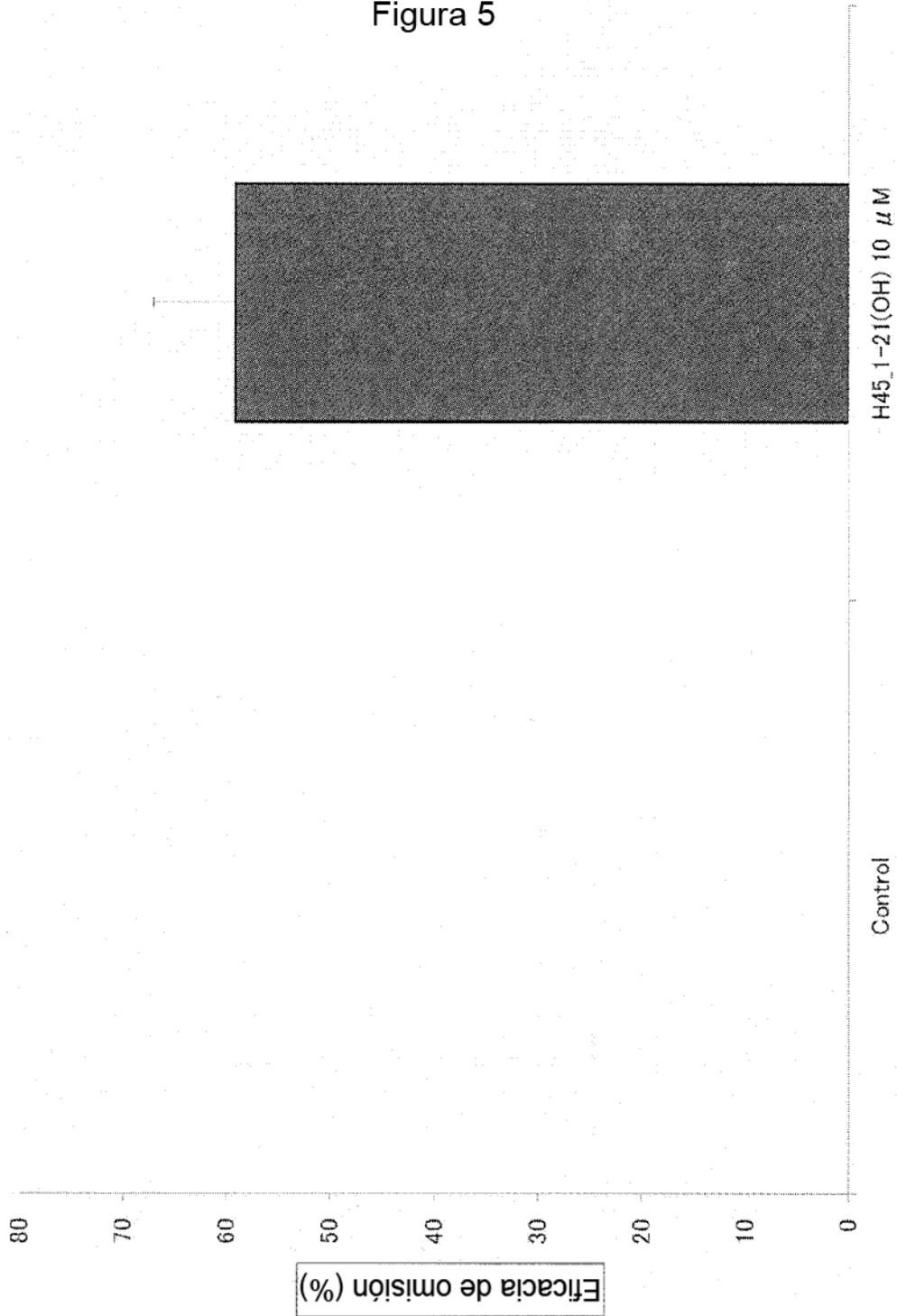


Figura 6

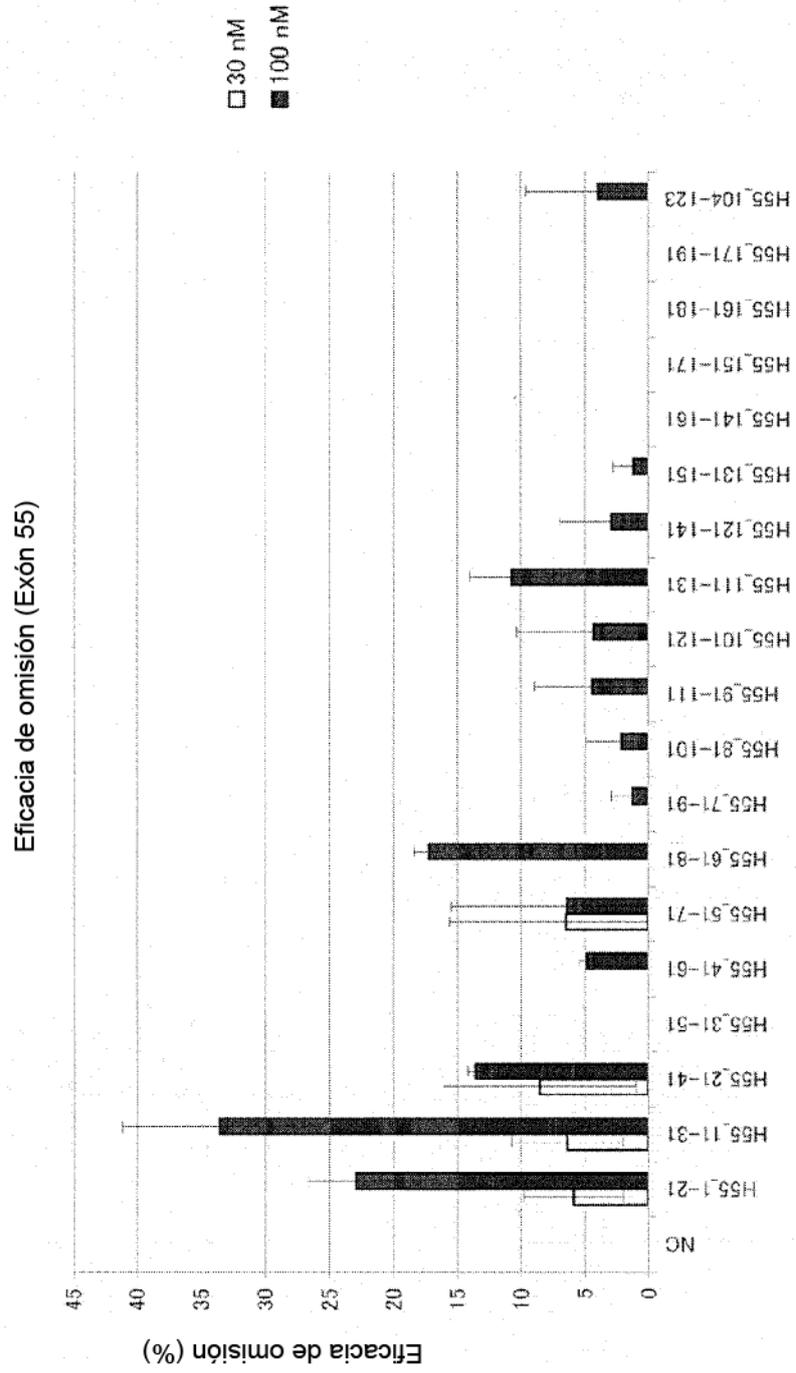


Figura 7

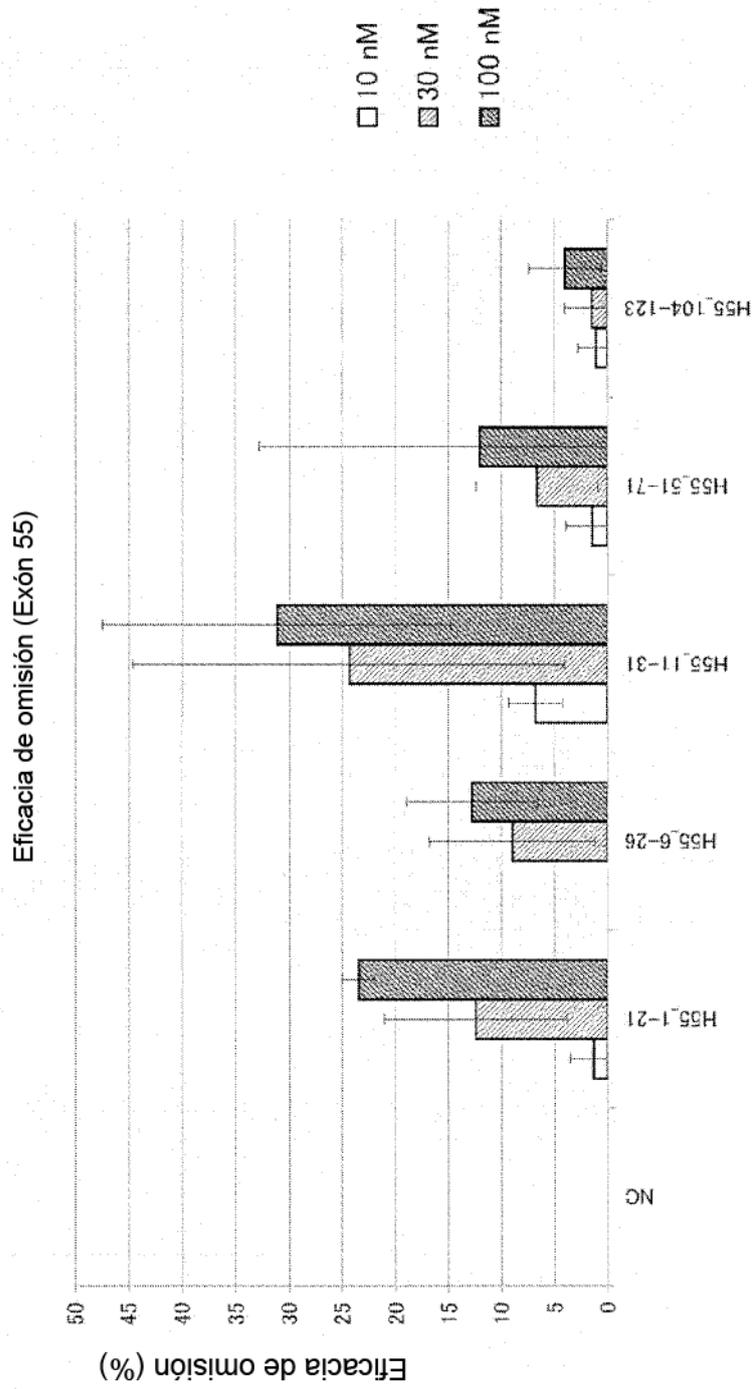


Figura 8

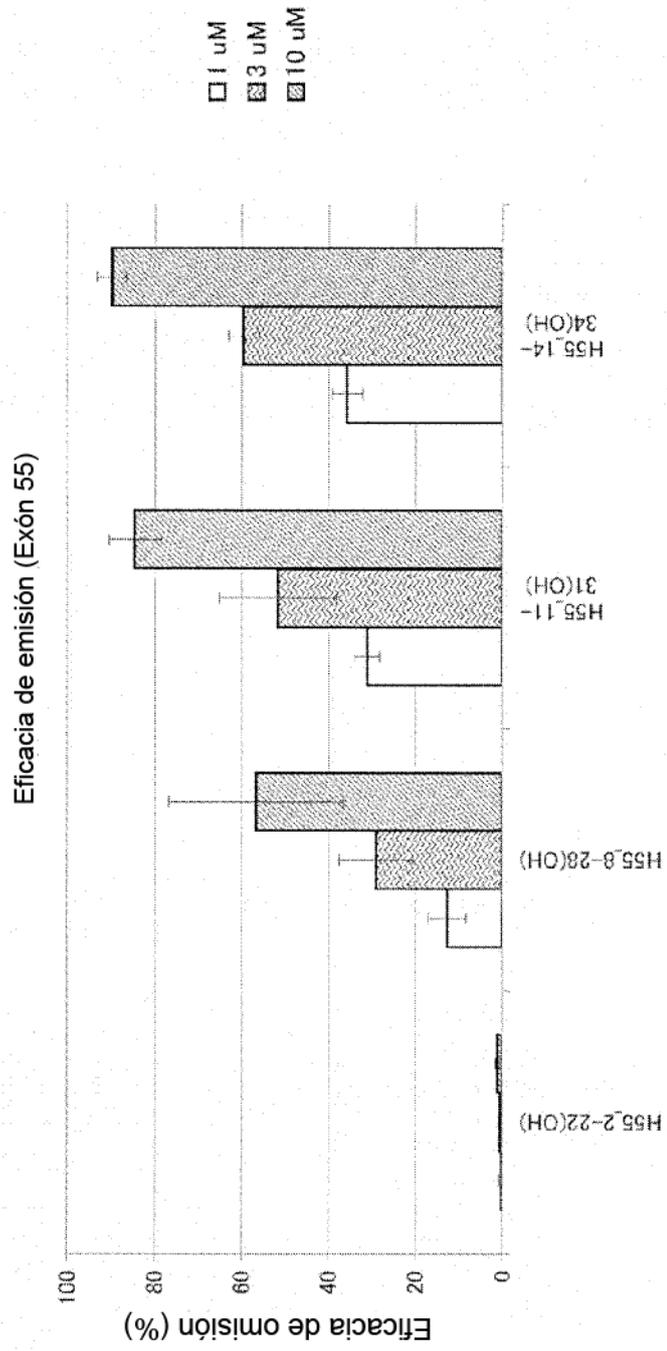


Figura 9

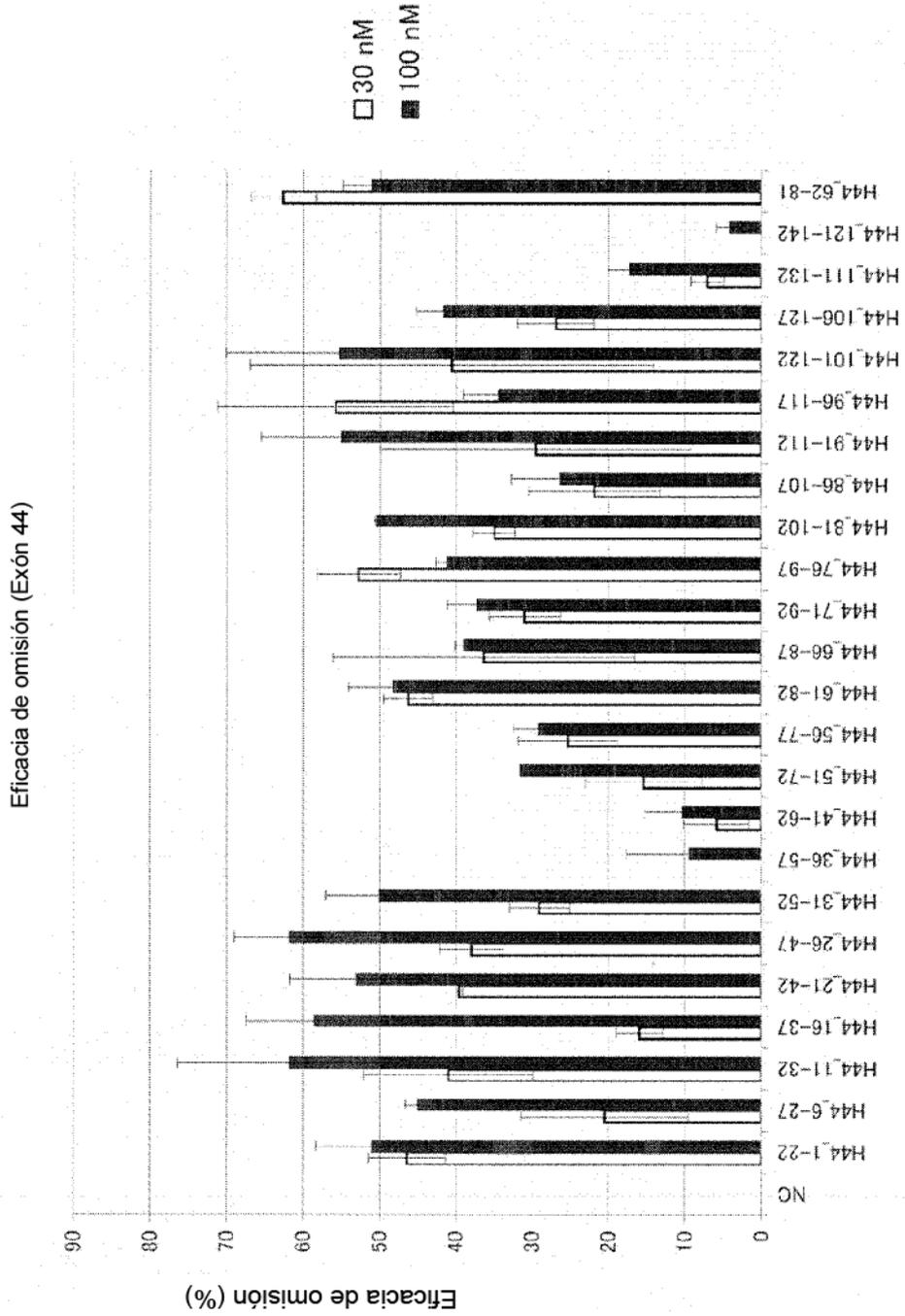


Figura 10

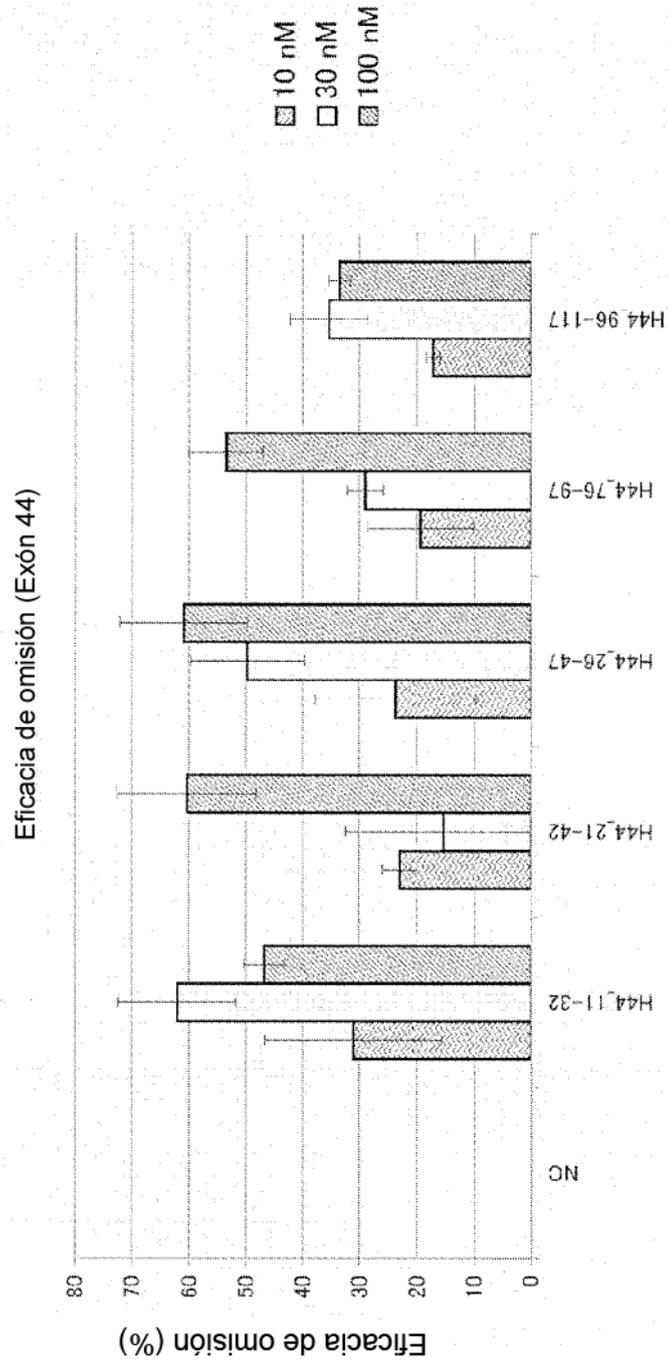


Figura 11

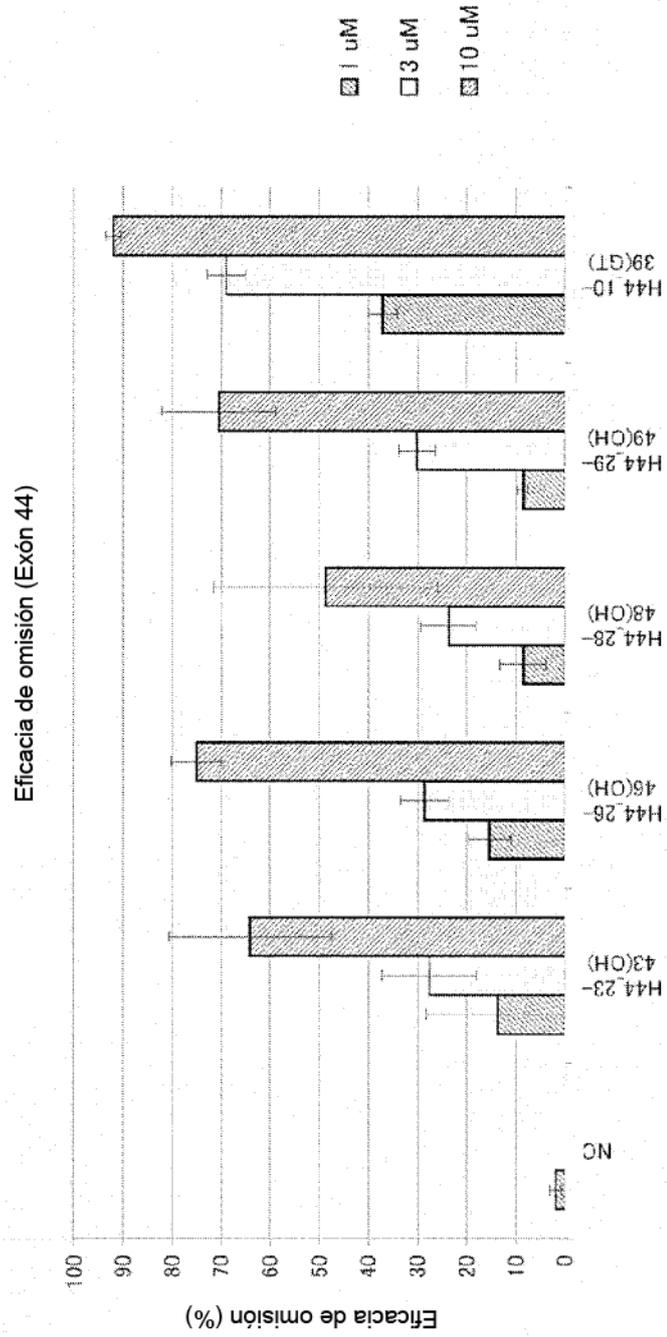


Figura 12

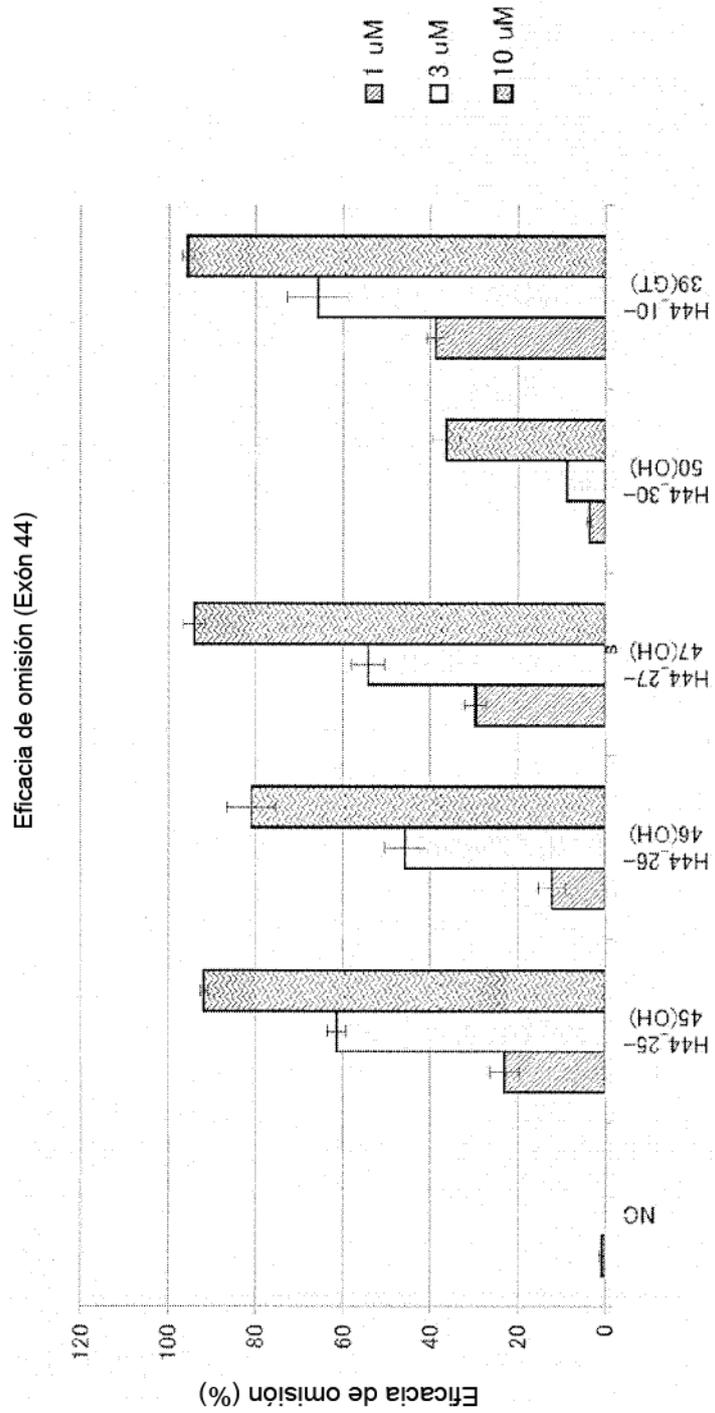


Figura 13

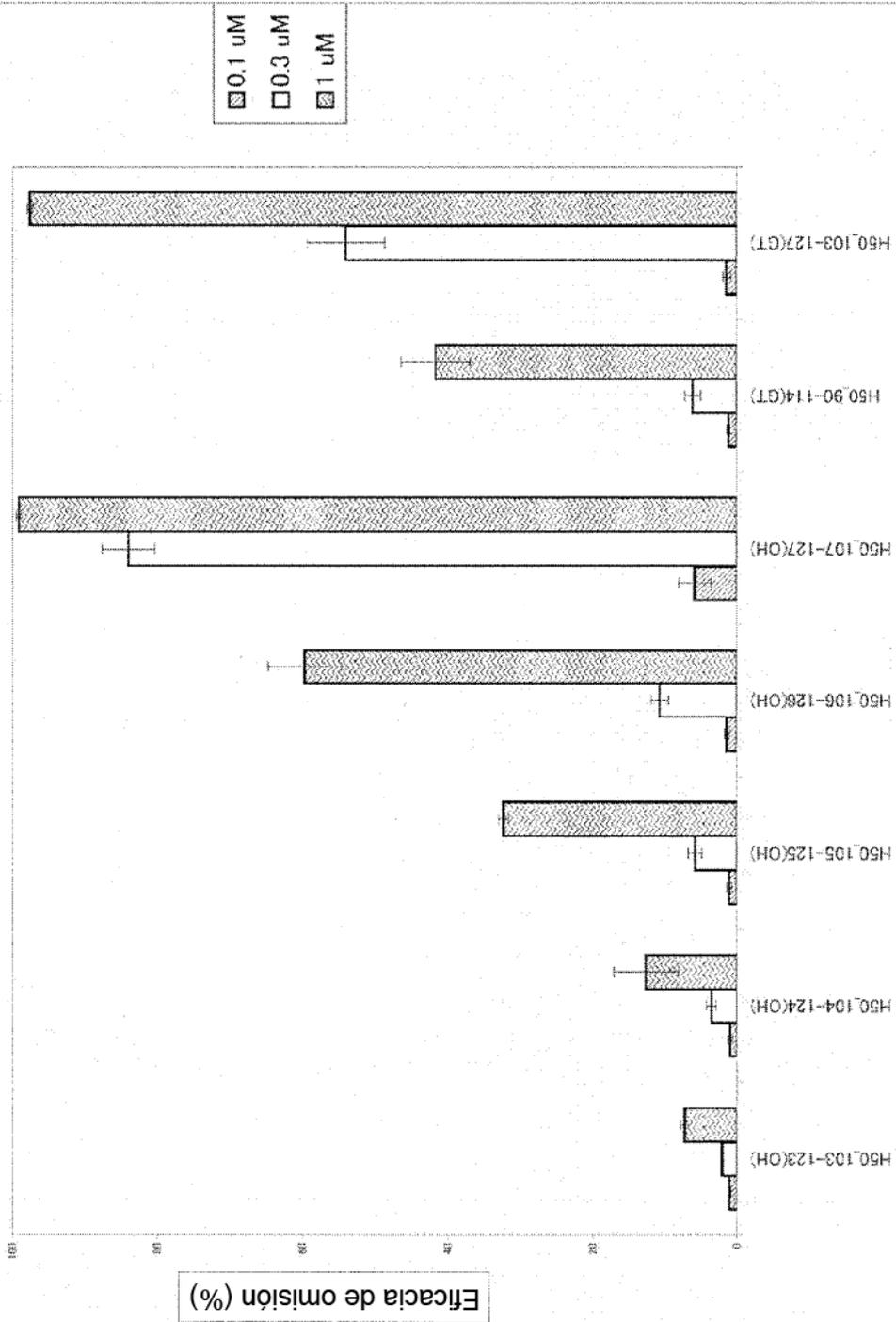


Figura 14

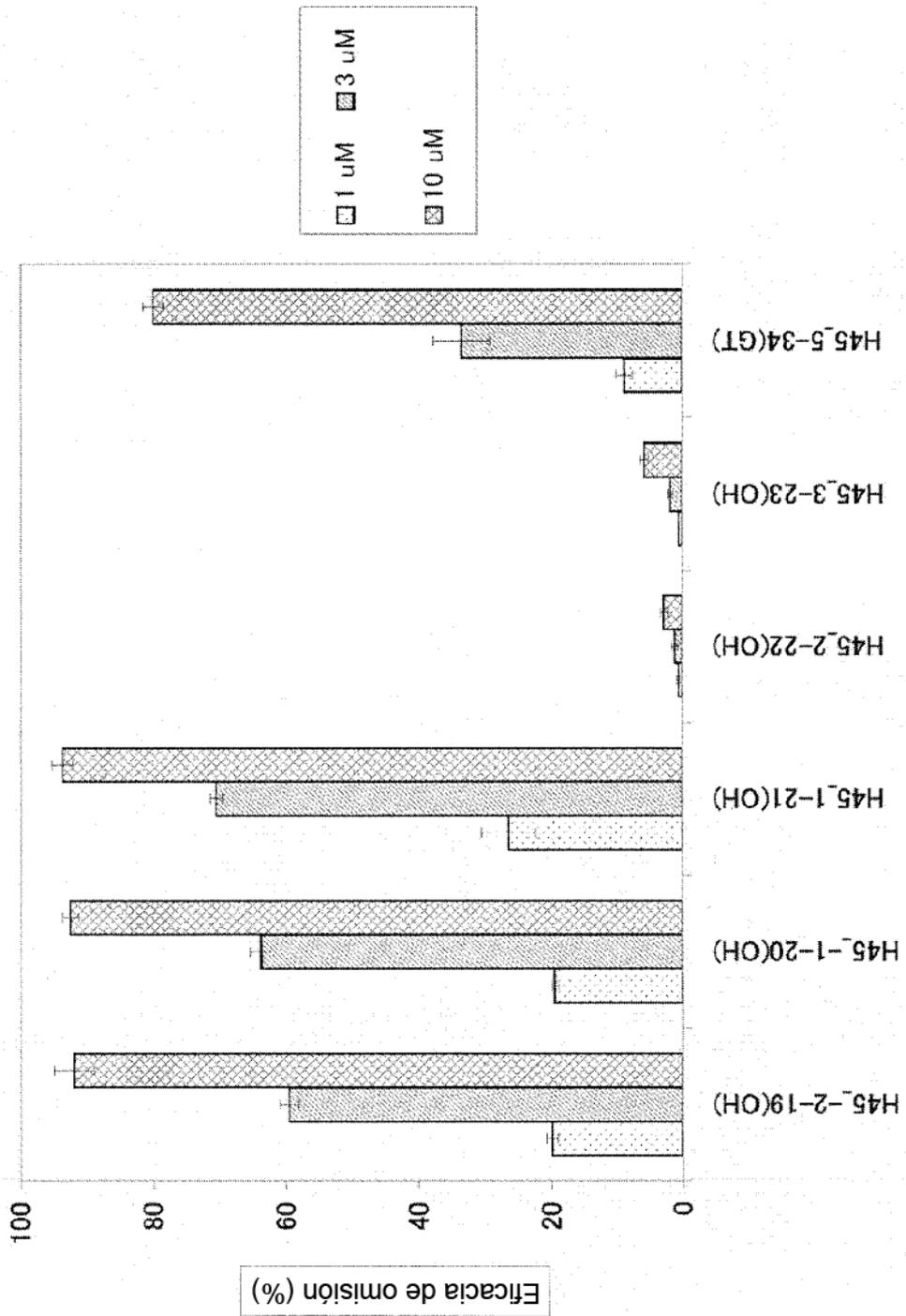


Figura 15

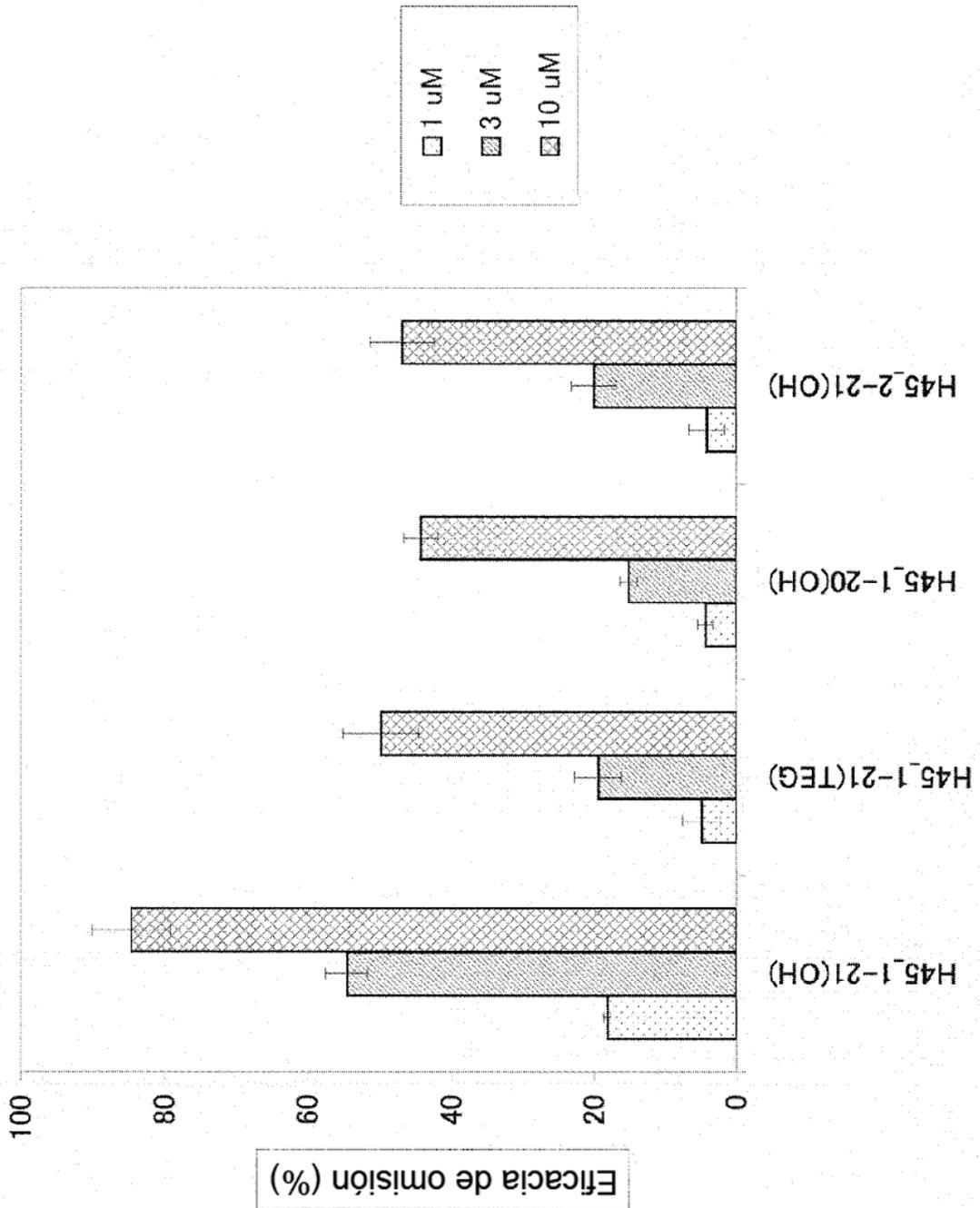


Figura 16

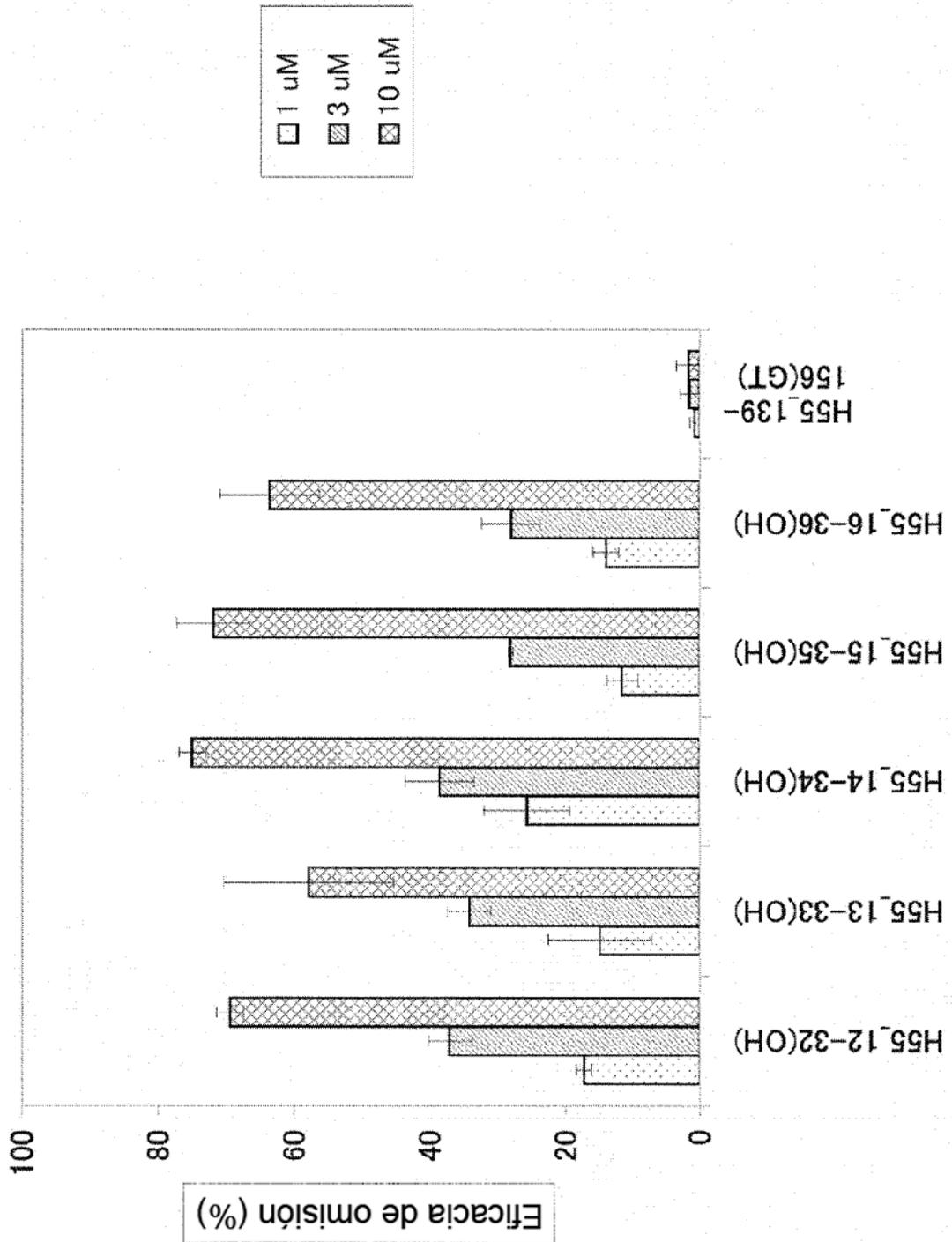


Figura 17

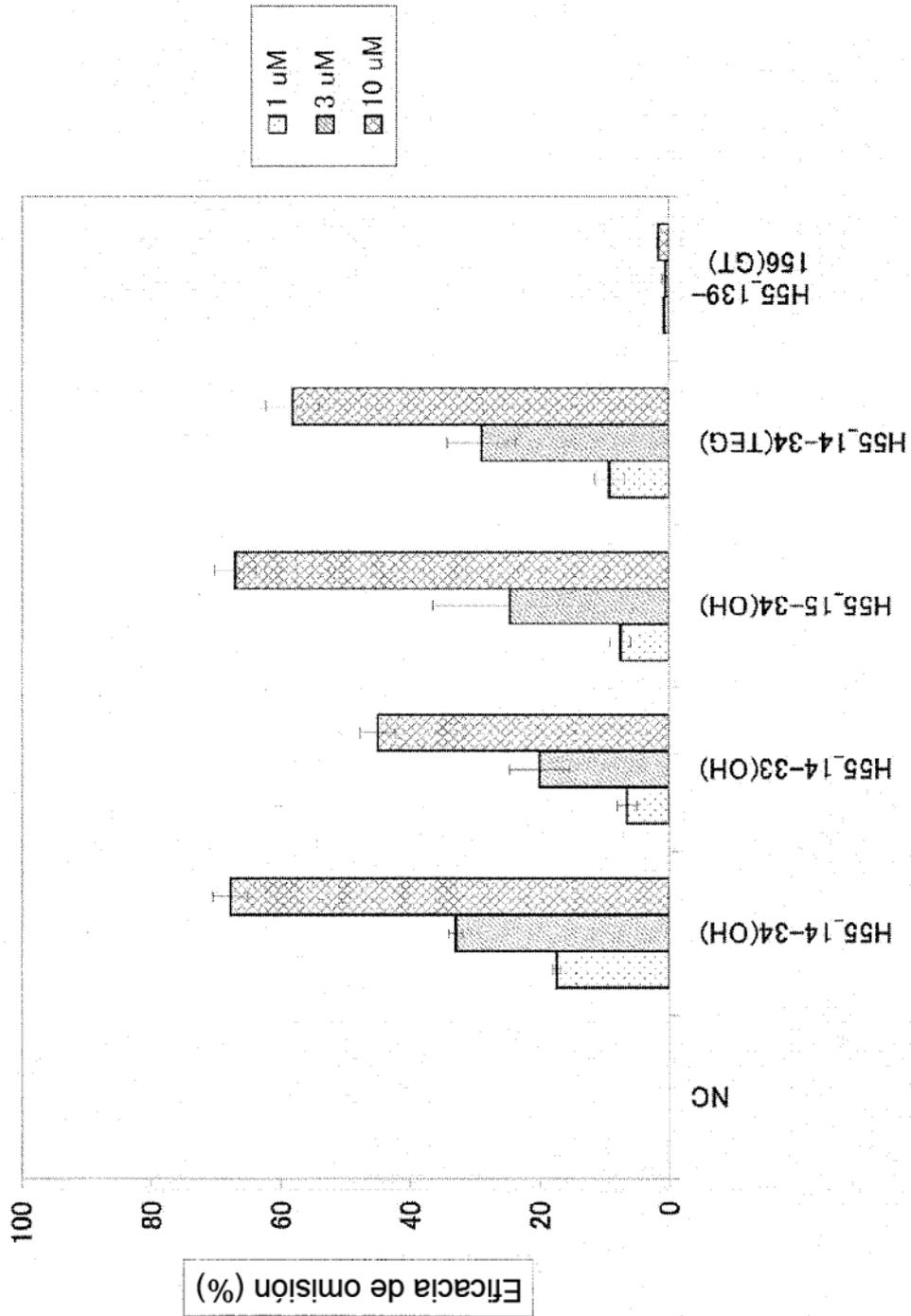


Figura 18

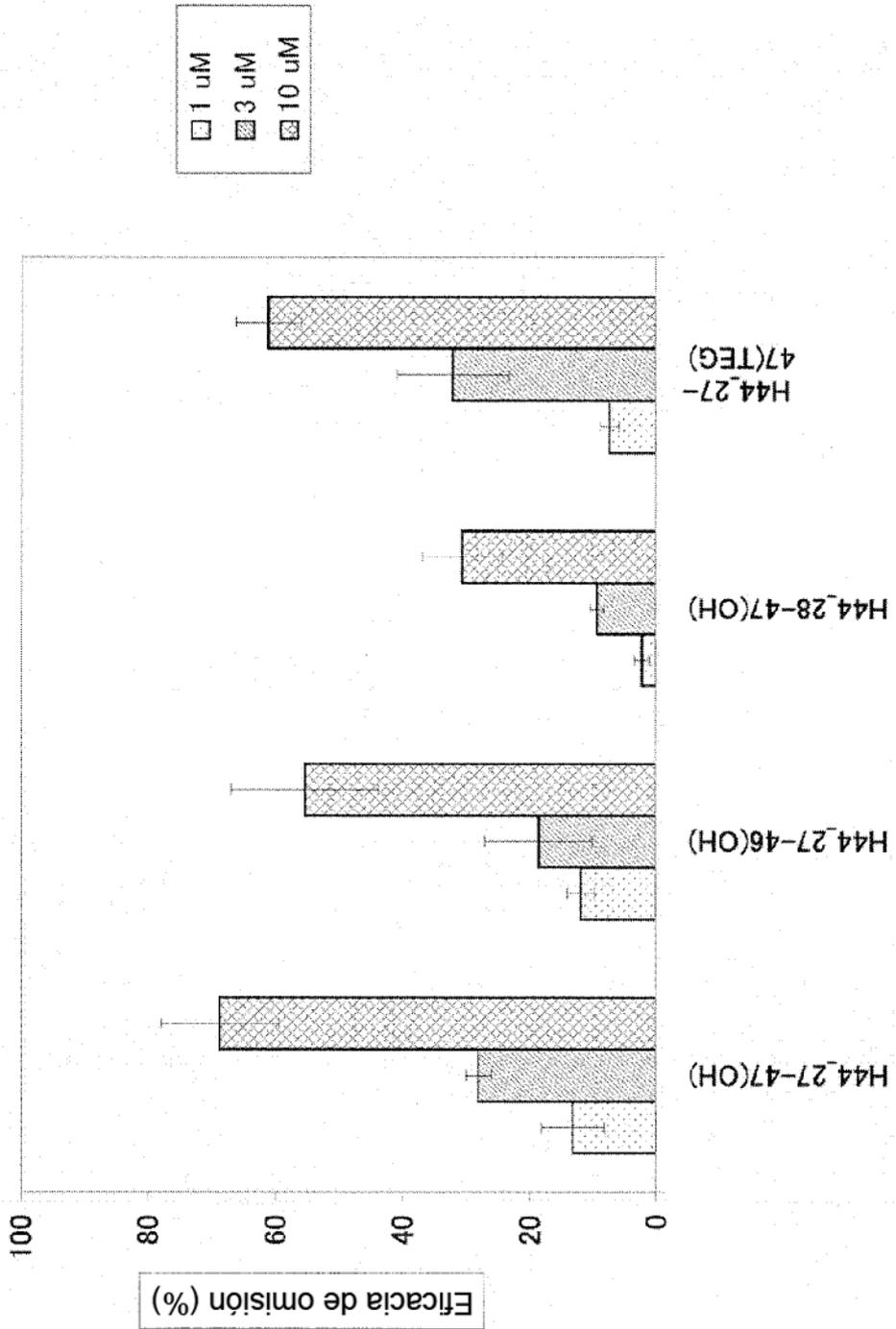


Figura 19

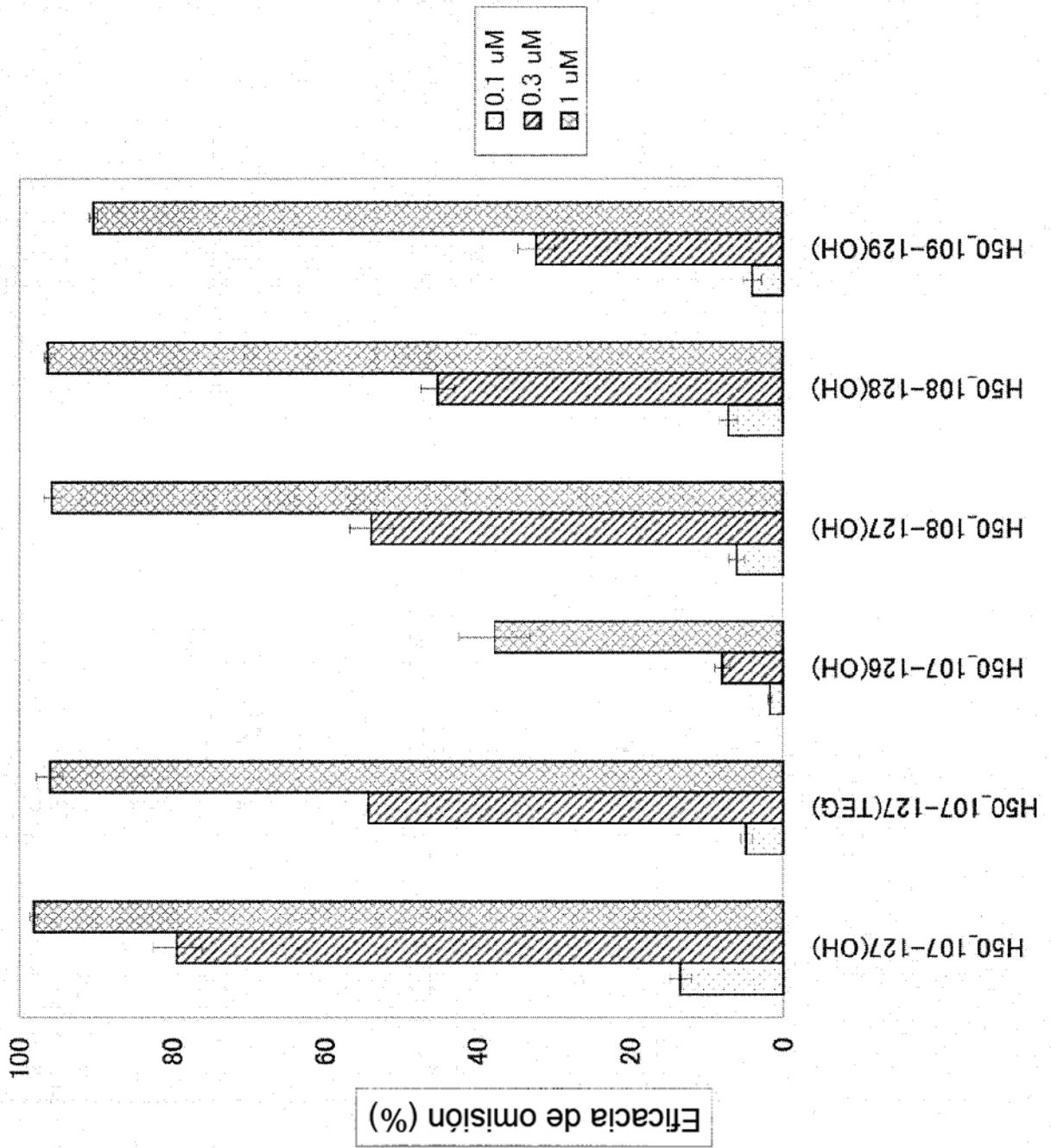


Figura 20

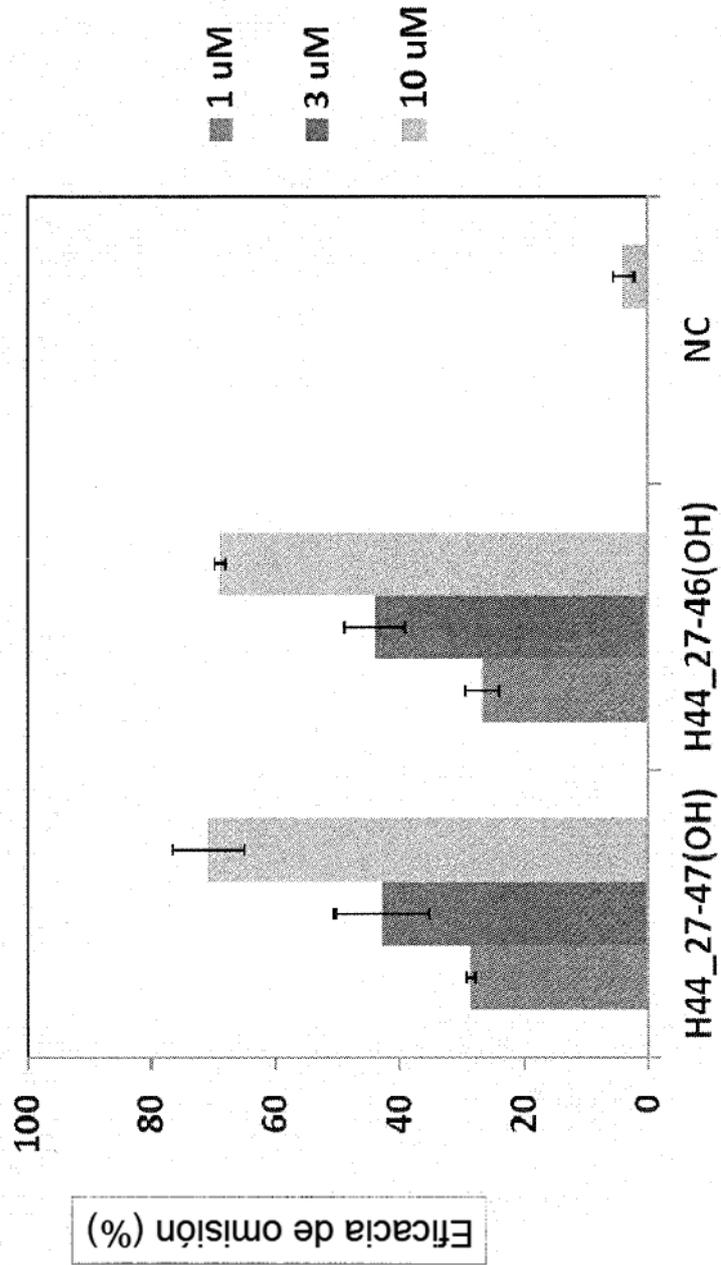


Figura 21

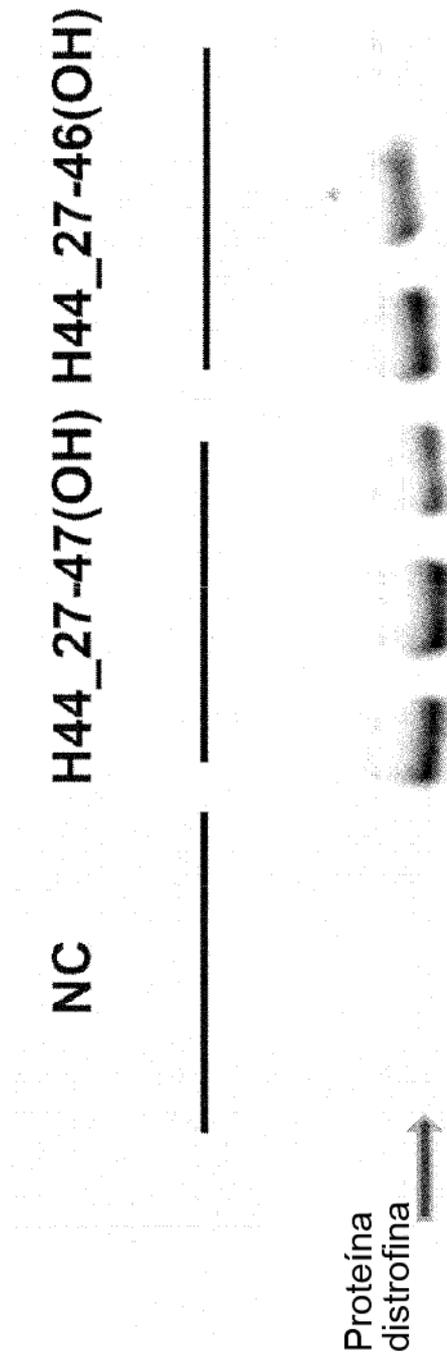


Figura 22

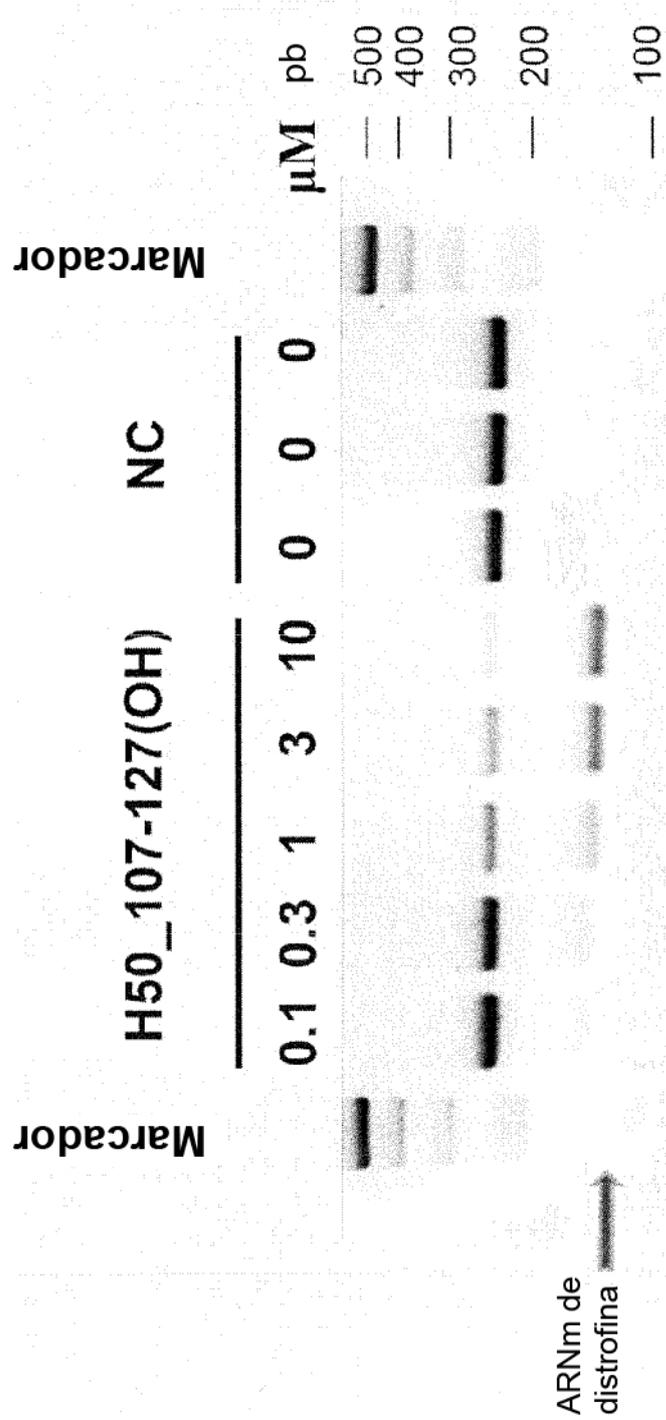


Figura 23

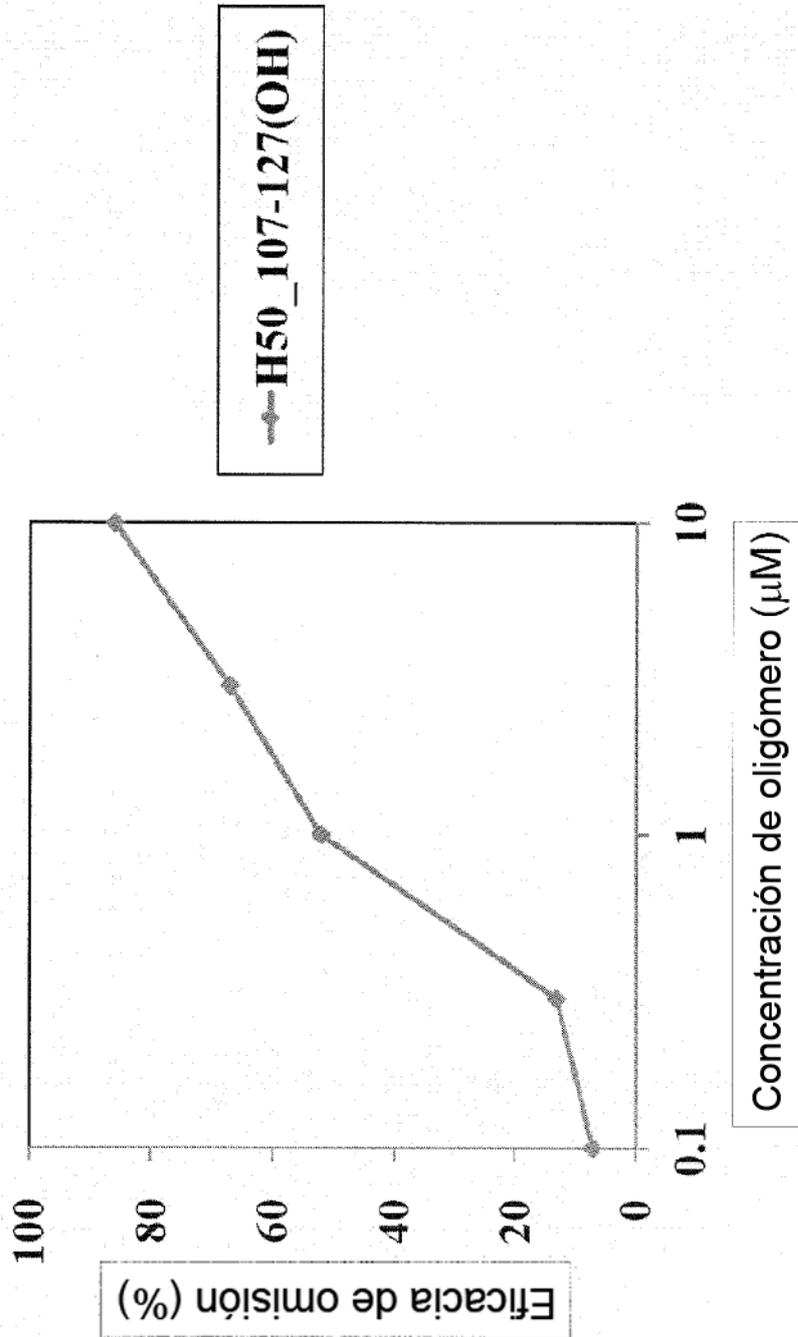


Figura 24

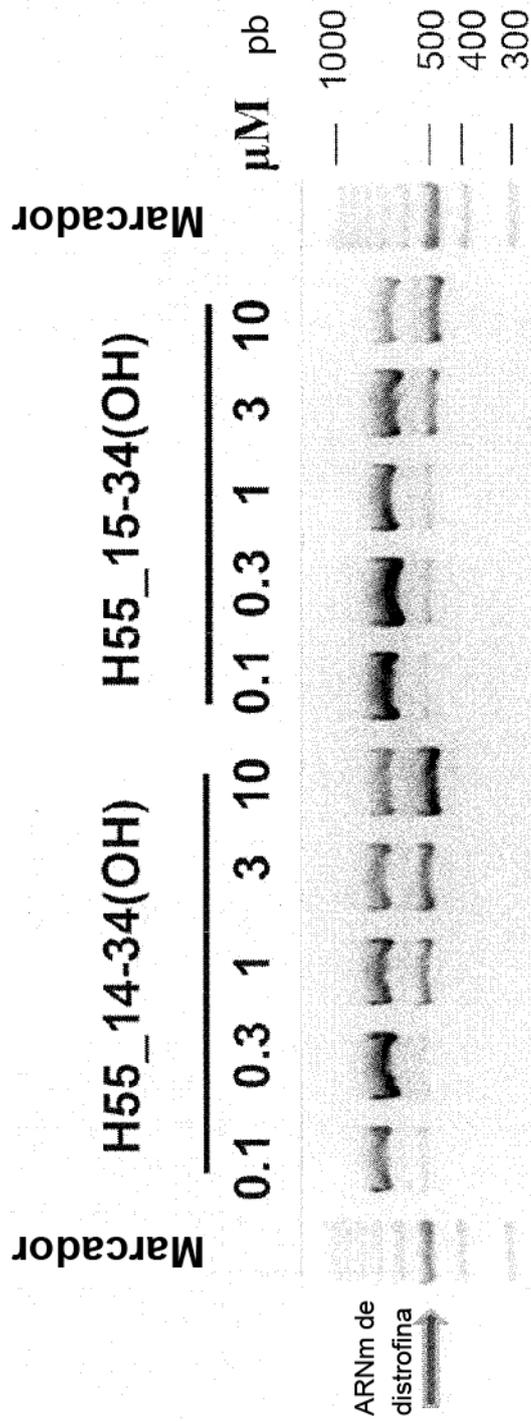


Figura 25

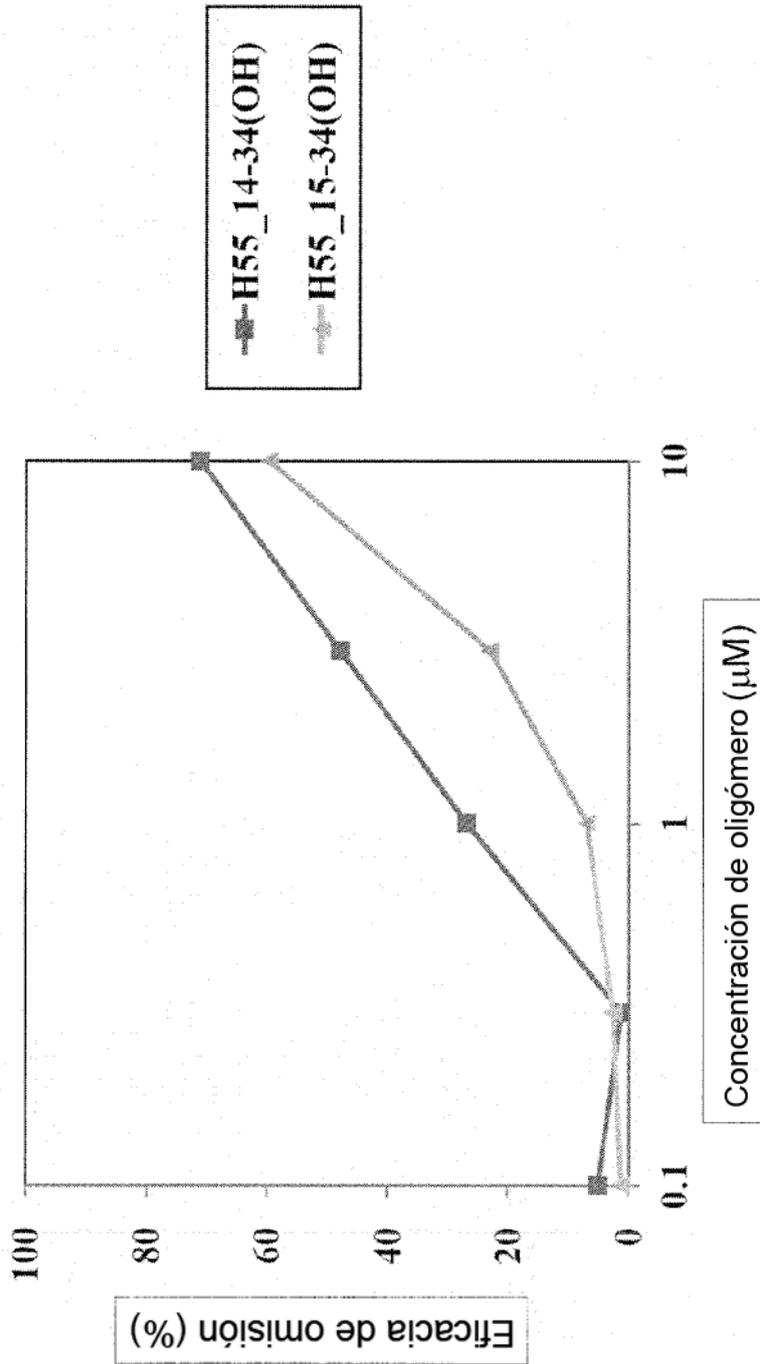


Figura 26

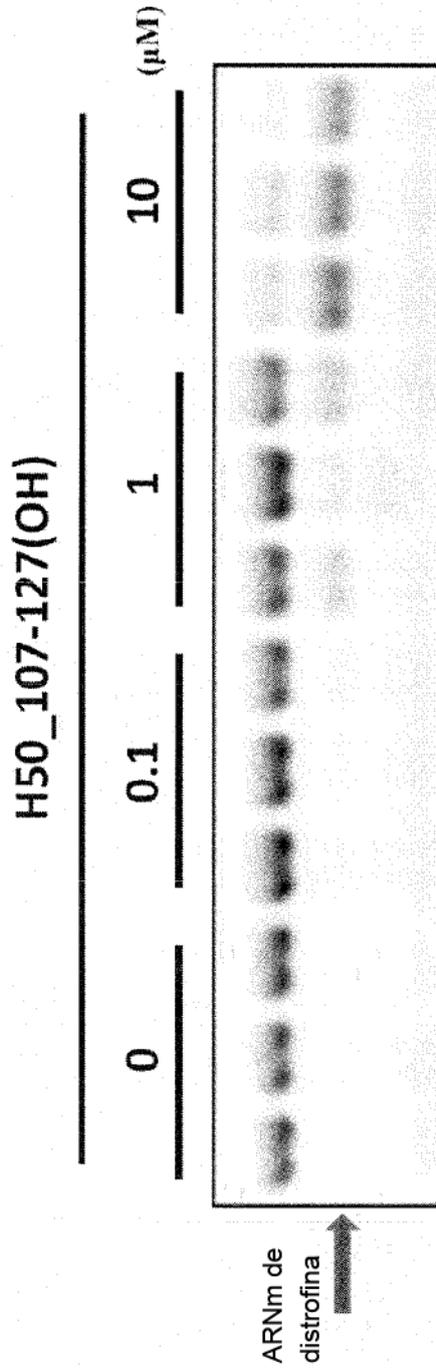


Figura 27

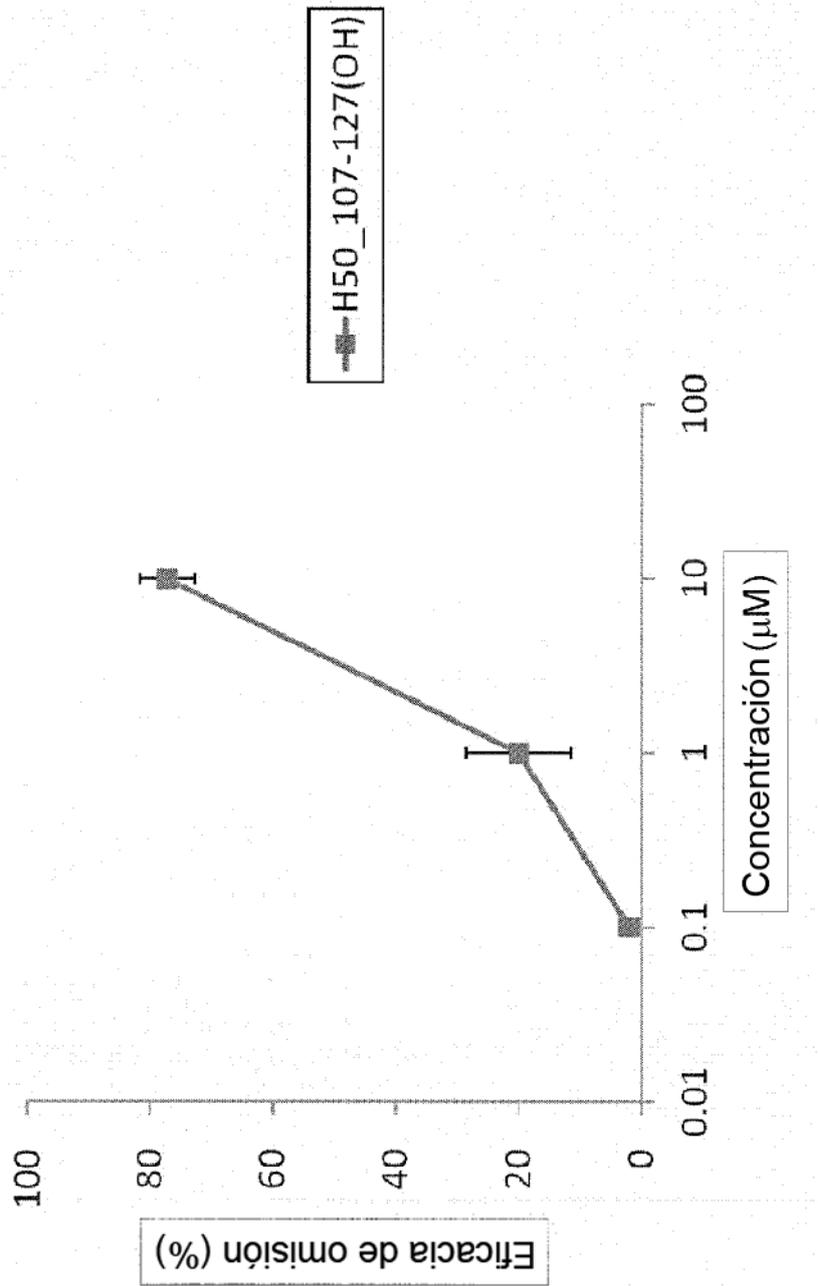


Figura 28

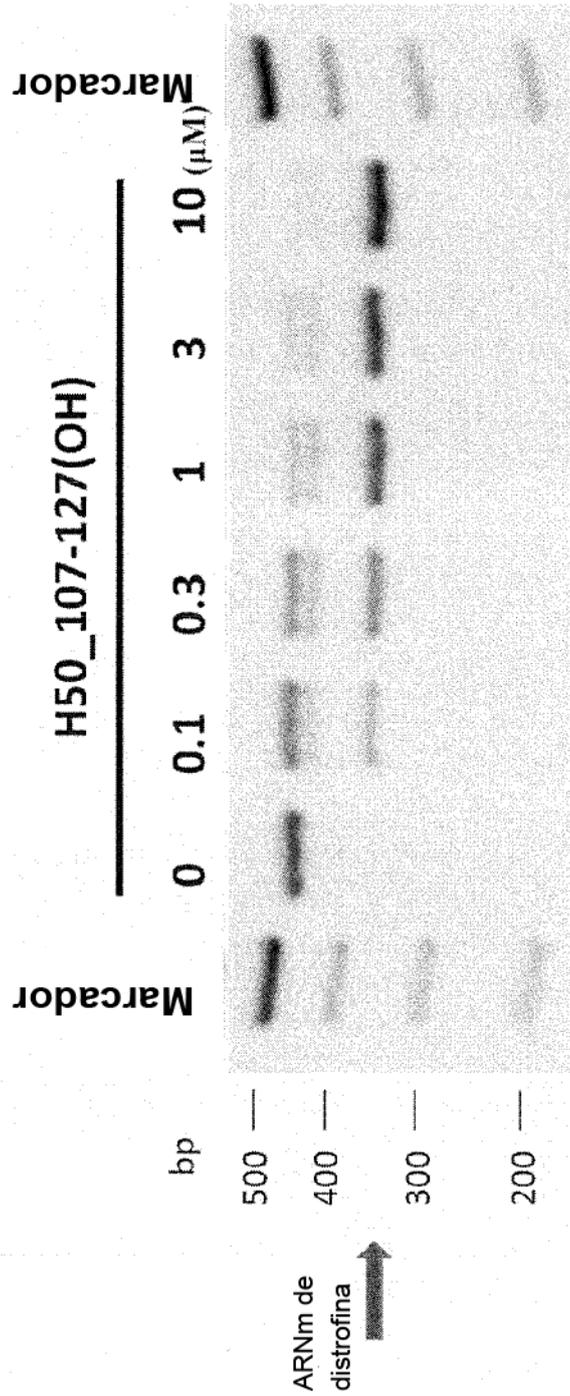


Figura 29

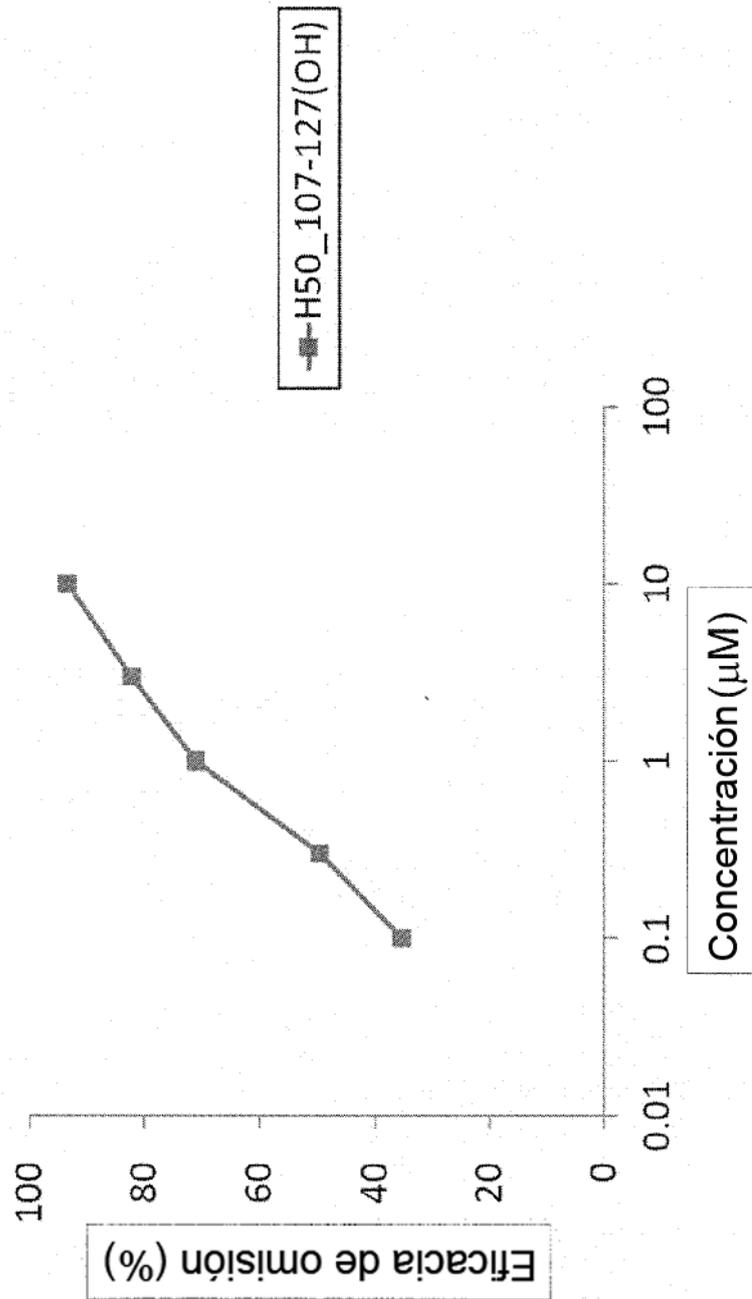


Figura 30

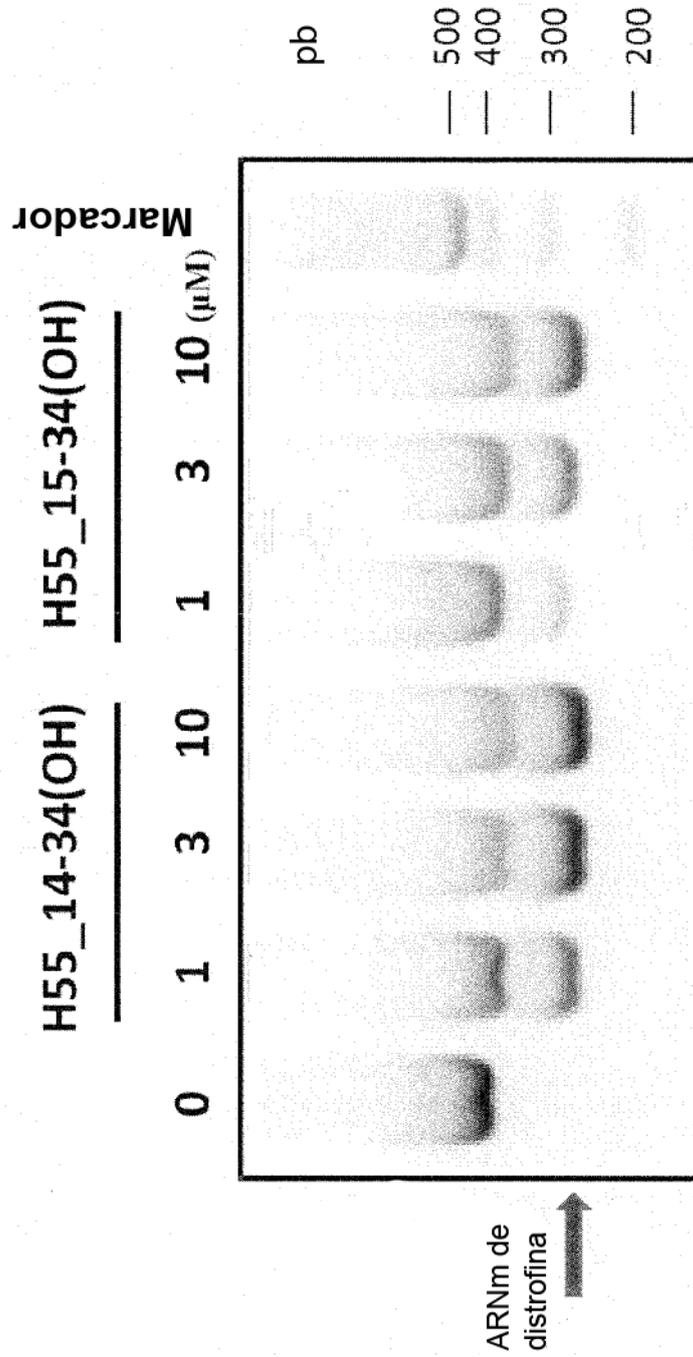


Figura 31

