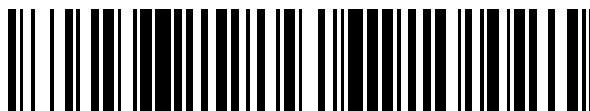


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 748**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7125 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2011 E 15199455 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3018211**

54 Título: **Ácidos nucleicos antisentido**

30 Prioridad:

01.09.2010 JP 2010196032

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

27.03.2020

73 Titular/es:

**NIPPON SHINYAKU CO., LTD. (50.0%)
14, Kisshoin Nishinoshō Monguchicho, Minami-ku Kyoto-shi
Kyoto 601-8550, JP y
NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**WATANABE, NAOKI;
SATOU, YOUHEI;
TAKEDA, SHIN'ICHI y
NAGATA, TETSUYA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 750 748 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

Ácidos nucleicos antisentido

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un oligómero antisentido que causa salto del exón 53 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 aproximadamente 3.500 niños recién nacidos. Aunque las funciones motoras raramente son diferentes de seres humanos sanos en la infancia y la niñez, se observa debilidad muscular en niños de aproximadamente 4 a 5 años de edad. Después, la debilidad muscular progresa hasta la pérdida de ambulación en aproximadamente 12 años de edad y muerte debido a Insuficiencia cardíaca o respiratoria a los veinte años. DMD es un trastorno grave. Actualmente, no existe terapia eficaz para DMD disponible, y se ha deseado fuertemente desarrollar un nuevo agente terapéutico.

15 Se sabe que DMD está causada por una mutación en el gen de la distrofina. El gen de la distrofina está localizado en el cromosoma X y es un gen inmenso que consiste en 2,2 millones de pares de nucleótidos de ADN. El ADN se transcribe en precursores de ARNm, y los intrones se retiran por corte y empalme para sintetizar ARNm en que 79 exones se unen juntos. Este ARNm se traduce en 3.685 aminoácidos para producir la proteína distrofina. La proteína distrofina está asociada con el mantenimiento de la estabilidad de la membrana en células musculares y es necesaria para hacer que las células musculares sean menos frágiles. El gen de la distrofina de pacientes con DMD contiene una mutación y, por tanto, la proteína distrofina, que es funcional en células musculares, raramente se expresa. Por lo tanto, la estructura de las células musculares no puede mantenerse en el organismo de los pacientes con DMD, lo que conduce a un gran flujo entrante de iones calcio en las células musculares. Por consiguiente, sucede una respuesta tipo inflamación que promueve fibrosis de modo que las células musculares puedan regenerarse solamente con dificultad.

25 La distrofia muscular de Duchenne (BMD) también está causada por una mutación en el gen de la distrofina. Los síntomas implican debilidad muscular acompañada por atrofia del músculo, pero normalmente son débiles y lentos en el progreso de la debilidad muscular, en comparación con DMD. En muchos casos, su aparición es en la edad adulta. Se considera que diferencias en los síntomas clínicos entre DMD y BMD residen en si la fase de lectura para los aminoácidos en la traducción del ARNm de distrofina en la proteína distrofina están alterados por la mutación o no (documento no de patente 1). Más específicamente, en DMD la presencia de mutación desplaza la fase de lectura de aminoácidos de modo que la expresión de proteína distrofina funcional se suprime, mientras que en BMD se produce la proteína distrofina que funciona, aunque de forma imperfecta, porque la fase de lectura de aminoácidos está conservada, aunque una parte de los exones está delecionada por la mutación.

35 Se espera que el salto de exones sirva como método para tratar DMD. Este método implica modificar el corte y empalme para restaurar la fase de lectura de aminoácidos del ARNm de distrofina e inducir la expresión de la proteína distrofina que tiene la función parcialmente restaurada (documento no de patente 2). Parte de la secuencia de aminoácidos, que es una diana para el salto 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 la fase de lectura de aminoácidos, la función de estabilizar las células musculares se retiene parcialmente. Por consiguiente, se espera que el salto de exones conduzca a que DMD tenga síntomas similares a los de BMD que son más leves. El enfoque de salto de exones ha pasado los ensayos animales usando ratones o perros y ahora se está evaluando actualmente en ensayos clínicos en pacientes humanos con DMD.

45 El salto de un exón puede inducirse por unión de ácidos nucleicos antisentido dirigidos al sitio de corte y empalme 5' o 3' o ambos sitios, o sitios internos de exones. Un exón solamente se incluirá en el ARNm cuando ambos sitios de corte y empalme del mismo se reconocen por el complejo de espliceosoma. Por tanto, el salto de exones puede inducirse abordando los sitios de corte y empalme con ácidos nucleicos antisentido. Además, la unión de una proteína SR a un potenciador exónico de corte y empalme (ESE) se considera necesaria para que un exón sea reconocido por el mecanismo de corte y empalme. Por consiguiente, el salto de exones también puede inducirse abordando ESE.

50 Como una mutación del gen de la distrofina puede variar dependiendo de los pacientes con DMD, los ácidos nucleicos antisentido tienen que diseñarse basándose en el sitio o en el tipo de mutación genética respectiva. En el pasado, se produjeron ácidos nucleicos antisentido que inducían el salto de exones para los 79 exones, por Steve Wilton, *et al.*, University of Western Australia (documento no de patente 3), y se produjeron ácidos nucleicos antisentido que inducían salto de exones para 39 exones por Annemieke Aartsma-Rus, *et al.*, Países Bajos (documento no de patente 4).

55 Se considera que aproximadamente el 8 % de todos los pacientes con DMD pueden tratarse por salto el 53° exón (a partir de ahora en este documento mencionado como "exón 53"). En los últimos años, una pluralidad de organizaciones de investigación informó sobre los estudios donde se abordaba el exón 53 en el gen de la distrofina para el salto de

exones (documentos de patente 1 a 4; documento no de patente 5). Sin embargo, aún no se ha establecido una técnica para el salto del exón 53 con una alta eficacia.

Documento de patente 1: publicación internacional WO 2006/000057

Documento de patente 2: publicación internacional WO 2004/048570

5 Documento de patente 3: US 2010/0168212

Documento de patente 4: publicación internacional WO 2010/048586

Documento no de patente 1: Monaco A. P. *et al.*, Genomics 1988; 2: pág. 90-95

Documento no de patente 2: Matsuo M., Brain Dev 1996; 18: pág. 167-172

Documento no de patente 3: Wilton S. D., *et al.*, Molecular Therapy 2007; 15: pág. 1288-96

10 Documento no de patente 4: Annemieke Aartsma-Rus *et al.*, (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77

Documento no de patente 5: Linda J. Popplewell *et al.*, (2010) Neuromuscular Disorders, vol. 20, n.º 2, pág. 102-10

Descripción de la invención

15 En las anteriores circunstancias, se han deseado oligómeros antisentido que induzcan fuertemente el salto del exón 53 en el gen de la distrofina y agentes terapéuticos para la distrofia muscular que comprendan oligómeros de los mismos.

20 Como resultado de estudios detallados de la estructura del gen de la distrofina, los presentes inventores han descubierto que puede inducirse el salto del exón 53 con una alta eficacia abordando la secuencia que consiste en los nucleótidos del 32º al 56º desde el extremo 5' del exón 53 en el precursor de ARNm (a partir de ahora en este documento mencionado como "pre-ARNm") en el gen de la distrofina con oligómeros antisentido. Basándose en este hallazgo, los presentes inventores han conseguido la presente invención.

Es decir, la presente invención es del siguiente modo.

[1] Un oligómero antisentido que causa el salto del 53º exón en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a los nucleótidos del 36º al 60º desde el extremo 5' del exón 53º en el gen de la distrofina humana.

25 [2] El oligómero antisentido de acuerdo con [1] anterior, que es un oligonucleótido.

[3] El oligómero antisentido de acuerdo con [2] anterior, en donde el resto de azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido está modificado.

30 [4] El oligómero antisentido de acuerdo con [3] anterior, 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 remplazado por uno cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br y I, donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquileo.

El oligómero antisentido de la presente invención puede inducir el salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana con una alta eficacia. Además, los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne pueden aliviarse de forma eficaz administrando la composición farmacéutica de la presente invención.

35 En el presente documento también se describe:

40 [1] Un oligómero antisentido que causa el salto del 53º exón en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias que consisten en los nucleótidos del 31º al 53º, del 31º al 54º, del 31º al 55º, del 31º al 56º, del 31º al 57º, del 31º al 58º, del 32º al 53º, del 32º al 54º, del 32º al 55º, del 32º al 56º, del 32º al 57º, del 32º al 58º, del 33º al 53º, del 33º al 54º, del 33º al 55º, del 33º al 56º, del 33º al 57º, del 33º al 58º, del 34º al 53º, del 34º al 54º, del 34º al 55º, del 34º al 56º, del 34º al 57º, del 34º al 58º, del 35º al 53º, del 35º al 54º, del 35º al 55º, del 35º al 56º, del 35º al 57º, del 35º al 58º, del 36º al 53º, del 36º al 54º, del 36º al 55º, del 36º al 56º, del 36º al 57º, o del 36º al 58º, desde el extremo 5' del exón 53º en el gen de la distrofina humana.

[2] El oligómero antisentido de acuerdo con [1] anterior, que es un oligonucleótido.

45 [3] El oligómero antisentido de acuerdo con [2] anterior, en donde el resto de azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido está modificado.

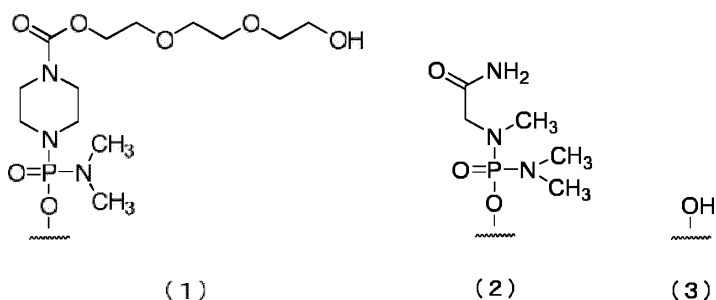
[4] El oligómero antisentido de acuerdo con [3] anterior, en donde el resto de azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo 2'-OH está remplazado por uno cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br y I (en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquileo).

5 [5] El oligómero antisentido de acuerdo con [3] o [4] anterior, en donde la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es uno cualquiera seleccionado entre el grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace boranofosfato.

[6] El oligómero antisentido de acuerdo con [1] anterior, que es un oligómero morfolino.

[7] El oligómero antisentido de acuerdo con [6] anterior, que es un oligómero fosforodiamidato morfolino.

10 [8] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7] anterior, donde el extremo 5' es uno cualquiera de los grupos de fórmulas químicas (1) a (3) siguientes:



15 [9] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8] anterior, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a las secuencias que consisten en nucleótidos del 32° al 56° o del 36° al 56° desde el extremo 5' del exón 53° en el gen de la distrofina humana.

[10] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8] anterior, que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2 a 37.

20 [11] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8] anterior, que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por una cualquiera seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NOS: 11, 17, 23, 29 y 35.

[12] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8] anterior, que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por SEQ ID NO: 11 o 35.

25 [13] Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende como principio activo el oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12] anterior, o una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en la línea celular de rabdomiosarcoma humano (células RD).

30 La FIG. 2 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células donde el gen mioD humano se introduce en fibroblastos derivados de tejido normal humano (células TIG-119) para inducir diferenciación en células musculares.

La FIG. 3 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células donde el gen mioD humano se introduce en fibroblastos derivados de pacientes humanos con DMD (células 5017) para inducir diferenciación en células musculares.

35 La FIG. 4 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células donde el gen mioD humano se introduce en fibroblastos de pacientes humanos con DMD (con delección de los exones 45-52) para inducir diferenciación en células musculares.

40 La FIG. 5 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células donde el gen mioD humano se introduce en fibroblastos de pacientes humanos con DMD (con delección de los exones 48-52) para inducir diferenciación en células musculares.

La FIG. 6 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células donde el gen mioD humano se introduce en fibroblastos de pacientes humanos con DMD (con delección de los exones 48-52) para inducir diferenciación en células musculares.

5 La FIG. 7 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células donde el gen mioD humano se introduce en fibroblastos de pacientes humanos con DMD (con delección de los exones 45-52 o delección de los exones 48-52) para inducir diferenciación en células musculares.

La FIG. 8 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células donde el gen mioD humano se introduce en fibroblastos de pacientes humanos con DMD (con delección de los exones 45-52) para inducir diferenciación en células musculares.

10 La FIG. 9 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La FIG. 10 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La FIG. 11 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La FIG. 12 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La FIG. 13 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

15 La FIG. 14 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La FIG. 15 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La FIG. 16 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La FIG. 17 muestra la eficacia del salto del exón 53 (2'-OMe-S-ARN) de rabdomiosarcoma humano (células RD).

20 La FIG. 18 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las concentraciones respectivas de los oligómeros.

La FIG. 19 muestra la eficacia del salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana en células de rabdomiosarcoma humano (células RD) a las concentraciones respectivas de los oligómeros.

Mejor modo para realizar la invención

25 A partir de ahora en este documento, la presente invención se describe en detalle. Las realizaciones descritas a continuación pretenden presentarse a modo de ejemplo simplemente para describir la invención pero sin limitarse solamente a las siguientes realizaciones. La presente invención puede implementarse de diversos modos sin alejarse de la esencia de la invención.

30 Todas las publicaciones, solicitudes de patente publicadas, patentes y otros documentos de patente citados en la memoria descriptiva se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. La memoria descriptiva incorpora por el presente documento como referencia los contenidos de la memoria descriptiva y dibujos en la solicitud de patente japonesa (n.º 2010-196032) presentada el 1 de septiembre de 2010 a partir de la que se reivindicó la prioridad.

1. Oligómero antisentido

35 La presente invención proporciona el oligómero antisentido (a partir de ahora mencionado como "oligómero de la presente invención") que causa salto del 53º exón en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias (a partir de ahora también mencionadas como "secuencias diana") que consisten en nucleótidos del 36º al 60º, desde el extremo 5' del 53º exón en el gen de la distrofina humana.

40 En el presente documento también se describe un oligómero antisentido que causa el salto del 53º exón en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias (a partir de ahora también mencionadas como "secuencias diana") que consisten en los nucleótidos del 31º al 53º, del 31º al 54º, del 31º al 55º, del 31º al 56º, del 31º al 57º, del 31º al 58º, del 32º al 53º, del 32º al 54º, del 32º al 55º, del 32º al 56º, del 32º al 57º, del 32º al 58º, del 33º al 53º, del 33º al 54º, del 33º al 55º, del 33º al 56º, del 33º al 57º, del 33º al 58º, del 34º al 53º, del 34º al 54º, del 34º al 55º, del 34º al 56º, del 34º al 57º, del 34º al 58º, del 35º al 53º, del 35º al 54º, del 35º al 55º, del 35º al 56º, del 35º al 57º, del 35º al 58º, del 36º al 53º, del 36º al 54º, del 36º al 55º, del 36º al 56º, del 36º al 57º, o del 36º al 58º, desde el extremo 5' del exón 53º en el gen de la distrofina humana.

[Exón 53 en el gen de la distrofina humana]

En la presente invención, el término "gen" pretende indicar un gen genómico y también incluyen 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 Mpb y es el gen más grande entre los genes humanos conocidos. Sin embargo, las regiones codificantes del gen de la distrofina humana son solamente de 14 kb, interrumpidas como 79 exones en todo el gen de la distrofina humana (Roberts, R.G., *et al.*, Genomics, 16: 536-538 (1993)). El pre-ARNm, que es el transcrito del gen de la distrofina humana, experimenta corte y empalme para generar ARNm maduro de 14 kb. La secuencia de nucleótidos del gen de la distrofina humana de tipo silvestre es conocida (n.º de acceso a GenBank NM_004006).

La secuencia de nucleótidos del exón 53 en el gen de la distrofina humana de tipo silvestre está representada por la SEQ ID NO: 1.

El oligómero de la presente invención está diseñado para causar salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana, modificando de ese modo la proteína codificada por el tipo DMD del gen de la distrofina en el tipo BMD de la proteína distrofina. Por consiguiente, el exón 53 en el gen de la distrofina que es la diana del salto de exones por el oligómero de la presente invención incluye tipos tanto silvestres como mutantes.

Específicamente, los mutantes del exón 53 del gen de la distrofina humana incluyen los polinucleótidos definidos en (a) o (b) a continuación.

(a) Un polinucleótido que híbrida 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; y,

(b) Un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 90 % de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.

Como se usa en este documento, el término "polinucleótido" pretende indicar ADN o ARN.

Como se usa en este documento, la expresión "polinucleótido que híbrida en condiciones rigurosas" se refiere a, por ejemplo, un polinucleótido obtenido por hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación de Southern o similares, usando como sonda todo o parte de un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1. El método de hibridación que puede usarse incluye métodos descritos en, por ejemplo, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," etc.

Como se usa en este documento, la expresión "secuencia de nucleótidos complementaria" no se limita solamente a secuencias de nucleótidos que forman pares de Watson y Crick con las secuencias de nucleótidos diana, sino que pretende incluir también secuencias de nucleótidos que forman pares de bases de Wobble. Como se usa en este documento, la expresión par de Watson y Crick se refiere a un par de nucleobases en que se forman enlaces de hidrógeno entre adenina-timina, adenina-uracilo o guanina-citosina, y la expresión par de bases de Wobble se refiere a un par de nucleobases en que se forman enlaces de hidrógeno entre guanina-uracilo, inosina-uracilo, inosina-adenina o inosina-citosina. Como se usa en este documento, la expresión "secuencia de nucleótidos complementaria" no solamente 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 o 2, o un nucleótido no complementario a la secuencia de nucleótidos diana.

Como se usa en este documento, la expresión "condiciones rigurosas" puede ser cualquiera de las condiciones de rigurosidad baja, condiciones de rigurosidad moderada o condiciones de rigurosidad elevada. La expresión "condiciones de rigurosidad baja" es, por ejemplo, SSC 5x, solución de Denhardt 5x, SDS al 0,5 %, formamida al 50 % a 32 °C. La expresión "condiciones de rigurosidad moderada" es, por ejemplo, SSC 5x, solución de Denhardt 5x, SDS al 0,5 %, formamida al 50 % a 42 °C, o SSC 5x, SDS al 1 %, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), formamida al 50 % a 42 °C. La expresión "condiciones de rigurosidad elevada" es, por ejemplo, SSC 5x, solución de Denhardt 5x, SDS al 0,5 %, formamida al 50 % a 50 °C o SSC 0,2x, SDS al 0,1 % a 65 °C. En estas condiciones, se espera que los polinucleótidos con mayor homología se obtengan de forma eficaz a temperaturas más elevadas, aunque están implicados múltiples factores en la rigurosidad de hibridación incluyendo temperatura, concentración de sonda, longitud de onda, fuerza iónica, tiempo, concentración salina y otros, y los expertos en la materia pueden seleccionar apropiadamente estos factores para conseguir rigurosidad similar.

Cuando se usan kits disponibles en el mercado para hibridación, por ejemplo, puede usarse un sistema de marcaje directo y detección Alkphos (GE Healthcare). En este caso, de acuerdo con el protocolo adjunto, después de cultivar con una sonda marcada durante la noche, la membrana se lava con un tampón de lavado principal que contiene SDS al 0,1 % (p/v) a 55 °C, detectando de ese modo polinucleótidos hibridados. Como alternativa, en la producción de una sonda basada en la totalidad o parte de la secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, puede detectarse hibridación con un Kit de Detección de Ácido Nucleico DIG (Roche Diagnostics) cuando la sonda está marcada con digoxigenina (DIG) usando un reactivo disponible en el mercado (por ejemplo, una Mezcla de Marcaje de PCR (Roche Diagnostics), etc.).

ES 2 750 748 T3

Además de los polinucleótidos descritos anteriormente, otros polinucleótidos que pueden hibridarse incluyen polinucleótidos que tienen un 90 % o más, 91 % o más, 92 % o más, 93 % o más, 94 % o más, 95 % o más, 96 % o más, 97 % o más, 98 % o más, 99 % o más, 99,1 o más, 99,2 o más, 99,3 o más, 99,4 o más, 99,5 o más, 99,6 o más, 99,7 o más, 99,8 o más, 99,9 o más de identidad con el polinucleótido de la SEQ ID NO: 1, calculada por el software de búsqueda de homología BLAST usando los parámetros por defecto.

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

Ejemplos de las secuencias de nucleótidos complementarias a las secuencias que consisten en los nucleótidos del 31° al 53°, del 31° al 54°, del 31° al 55°, del 31° al 56°, del 31° al 57°, del 31° al 58°, del 32° al 53°, del 32° al 54°, del 32° al 55°, del 32° al 56°, del 32° al 57°, del 32° al 58°, del 33° al 53°, del 33° al 54°, del 33° al 55°, del 33° al 56°, del 33° al 57°, del 33° al 58°, del 34° al 53°, del 34° al 54°, del 34° al 55°, del 34° al 56°, del 34° al 57°, del 34° al 58°, del 35° al 53°, del 35° al 54°, del 35° al 55°, del 35° al 56°, del 35° al 57°, del 35° al 58°, del 36° al 53°, del 36° al 54°, del 36° al 55°, del 36° al 56°, del 36° al 57° y del 36° al 58°, desde el extremo 5' del exón 53.

Tabla 1

Secuencia diana en el exón 53	Secuencia de nucleótidos complementaria	SEQ ID NO:
31-53	5'-CCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA-3'	SEQ ID NO: 2
31-54	5'-TCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA-3'	SEQ ID NO: 3
31-55	5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA-3'	SEQ ID NO: 4
31-56	5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA-3'	SEQ ID NO: 5
31-57	5'-GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA-3'	SEQ ID NO: 6
31-58	5'-TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTA-3'	SEQ ID NO: 7
32-53	5'-CCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT-3'	SEQ ID NO: 8
32-54	5'-TCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT-3'	SEQ ID NO: 9
32-55	5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT-3'	SEQ ID NO: 10
32-56	5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT-3'	SEQ ID NO: 11
32-57	5'-GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT-3'	SEQ ID NO: 12
32-58	5'-TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGT-3'	SEQ ID NO: 13
33-53	5'-CCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'	SEQ ID NO: 14
33-54	5'-TCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'	SEQ ID NO: 15
33-55	5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'	SEQ ID NO: 16
33-56	5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'	SEQ ID NO: 17
33-57	5'-GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'	SEQ ID NO: 18

ES 2 750 748 T3

33-58	5'-TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTG-3'	SEQ ID NO: 19
34-53	5'-CCGGTTCTGAAGGTGTTCTT-3'	SEQ ID NO: 20
34-54	5'-TCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT-3'	SEQ ID NO: 21
34-55	5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT-3'	SEQ ID NO: 22
34-56	5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT-3'	SEQ ID NO: 23
34-57	5'-GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT-3'	SEQ ID NO: 24
34-58	5'-TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTT-3'	SEQ ID NO: 25
35-53	5'-CCGGTTCTGAAGGTGTTCT-3'	SEQ ID NO: 26
35-54	5'-TCCGGTTCTGAAGGTGTTCT-3'	SEQ ID NO: 27
35-55	5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT-3'	SEQ ID NO: 28
35-56	5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT-3'	SEQ ID NO: 29
35-57	5'-GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT-3'	SEQ ID NO: 30
35-58	5'-TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCT-3'	SEQ ID NO: 31
36-53	5'-CCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'	SEQ ID NO: 32
36-54	5'-TCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'	SEQ ID NO: 33
36-55	5'-CTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'	SEQ ID NO: 34
36-56	5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'	SEQ ID NO: 35
36-57	5'-GCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'	SEQ ID NO: 36
36-58	5'-TGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTTC-3'	SEQ ID NO: 37

Se prefiere que el oligómero de la presente invención consista en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias que consisten en los nucleótidos del 36° al 60° (por ejemplo, SEQ ID NO: 57), desde el extremo 5' del 53° exón en el gen de la distrofina humana.

5 En el presente documento también se describe un oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias que consiste en los nucleótidos del 32° al 56°, del 33° al 56°, del 34° al 56°, del 35° al 56° o del 36° al 56° (por ejemplo, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 35), desde el extremo 5' del 53° exón en el gen de la distrofina humana.

10 En el presente documento también se describe un oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una cualquiera de las secuencias que consiste en los nucleótidos del 32° al 56° o del 36° al 56° (por ejemplo, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 35), desde el extremo 5' del 53° exón en el gen de la distrofina humana.

La expresión "causar salto del 53° exón en el gen de la distrofina humana" pretende indicar que por unión del oligómero de la presente invención al sitio correspondiente en el exón 53 del transcrito (por ejemplo, pre-ARNm) del gen de la distrofina humana, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 54 se corta y empalma en el lado 3' de la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 3' del exón 51 en pacientes con

DMD con delección de, el exón 52 cuando el transcrito experimenta corte y empalme, provocando de ese modo la formación de ARNm maduro que está libre de desplazamiento de fase de codones.

5 En consecuencia, no se requiere que el oligómero de la presente invención tenga una secuencia de nucleótidos 100% complementaria a la secuencia diana, en lo que respecta a que causa salto del exón 53 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.

10 En este documento, el término "unión" descrito anteriormente pretende indicar que cuando el oligómero de la presente invención se mezcla con el transcrito del gen de la distrofina humana, ambos hibridan en condiciones fisiológicas para formar un ácido nucleico bicatenario. La expresión "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, de 25 a 40 °C, preferiblemente 37 °C, pH 5 a 8, preferiblemente pH 7,4 y 150 mM de concentración de cloruro sódico.

15 Se haya causado el salto del exón 53 en el gen de la distrofina humana o no puede confirmarse introduciendo el oligómero de la presente invención en una célula de expresión de distrofina (por ejemplo, células de rhabdomyosarcoma humano), amplificando la región que rodea el exón 53 del ARNm del gen de la distrofina humana a partir del ARN total de la célula de expresión de distrofina por RT-PCR y realizando PCR anidada o análisis de secuencia sobre el producto amplificado por PCR.

20 La eficacia del salto puede determinarse del siguiente modo. Se recoge el ARNm para el gen de la distrofina humana de células de ensayo; en el ARNm, se mide el nivel de polinucleótido "A" de la banda donde se ha saltado el exón 53 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda donde no se ha saltado el exón 53. Usando estos valores de medición de "A" y "B" se calcula la eficacia mediante la siguiente ecuación:

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

El oligómero de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido, oligómero morfolino o ácido peptidónucleico (PNA), que tiene una longitud de 18 a 28 nucleótidos. La longitud es preferiblemente desde 21 hasta 25 nucleótidos y se prefieren oligómeros morfolino.

25 El oligonucleótido descrito anteriormente (a partir de ahora en este documento mencionado como "el oligómero de la presente invención") es el oligómero de la presente invención compuesto por nucleótidos como unidades constituyentes. Dichos nucleótidos pueden ser cualquiera de ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados.

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

35 La nucleobase incluye, por ejemplo, adenina, guanina, hipoxantina, citosina, timina, uracilo, y bases modificadas de las mismas. Ejemplos de dichas nucleobases modificadas incluyen, aunque sin limitación, pseudouracilo, 3-metiluracilo, dihidrouracilo, 5-alquilcitosinas (por ejemplo, 5-metilcitosina), 5-alquiluracilos (por ejemplo, 5-etiluracilo), 5-halouracilos (5-bromouracilo), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidinas (6-metiluracilo), 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, 1-metiladenina, 1-metilhipoxantina, 2,2-dimetilguanina, 3-metilcitosina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5-metilaminometiluracilo, 5-metilcarbonilmetiluracilo, 5-metiloxiuracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético, 2-tiocitosina, purina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, isoguanina, indol, imidazol, xantina, etc.

40 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 remplazo del OH 2' de ribosa con OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br o I, en donde R representa un alquilo o un arilo y R' representa un alquileo.

45 La modificación para las otras posiciones del azúcar incluye, por ejemplo, remplazo de O en la posición 4' de ribosa o desoxirribosa con S, enlace entre las posiciones 2' y 4' del azúcar, por ejemplo, LNA (ácido nucleico bloqueado) o ENA (ácidos nucleicos unidos por 2'-O,4'-C-etileno), pero no se limita a ello.

50 Una modificación de la región de unión a fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de remplazo de enlace fosfodiéster con enlace fosforotioato, enlace fosforoditioato, enlace alquilfosfonato, enlace fosforamidato o enlace boranofosfato (Enya *et al.*: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (véase, por ejemplo, republicaciones locales de Japón de las solicitudes PCT n.º 2006/129594 y 2006/038608).

El alquilo es preferiblemente un alquilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. 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 dichos 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.

El halógeno incluye flúor, cloro, bromo y yodo.

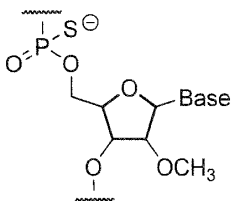
5 El alcoxi es un alcoxi lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono tal como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentiloxi, isopentiloxi, n-hexiloxi, isohexiloxi, etc. Entre otros, se prefiere un alcoxi que tiene de 1 a 3 átomos de carbono.

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

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

15 El acilo incluye un alcanóilo, o aroílo lineal o ramificado. Ejemplos de alcanóilo incluyen formilo, acetilo, 2- metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoílo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoílo, etc. Ejemplos del aroílo incluyen benzoílo, toluoílo y naftoílo. El aroílo puede estar opcionalmente sustituido en posiciones sustituibles y puede estar sustituido con uno o más alquilos.

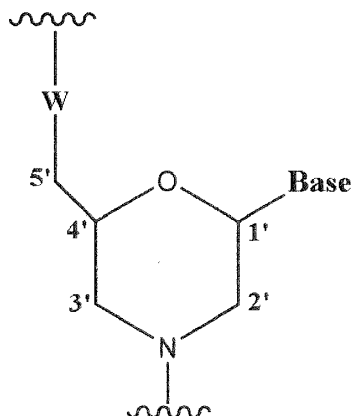
20 Preferiblemente, el oligonucleótido de la presente invención es el oligómero de la presente invención que contiene una unidad constituyente representada por la siguiente fórmula general donde el grupo-OH en la posición 2' de ribosa está sustituido con metoxi y la región de unión a fosfato es un enlace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



en donde Base representa una nucleobase.

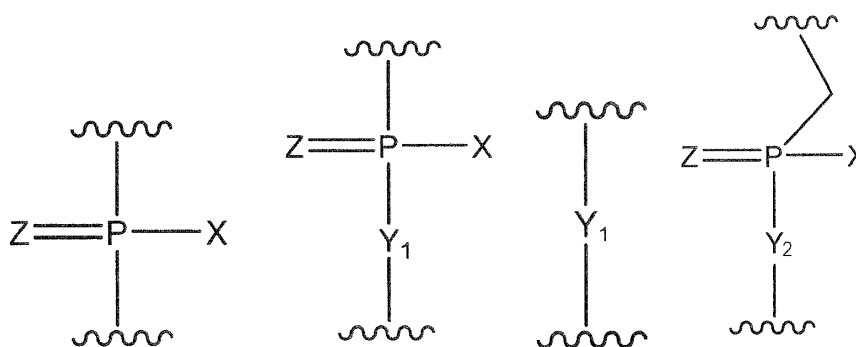
25 El oligonucleótido de la presente invención puede sintetizarse fácilmente usando diversos sintetizadores automatizados (por ejemplo, AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). Como alternativa, la síntesis también puede encargarse a una tercera organización (por ejemplo, Promega Inc., o Takara Co.), etc.

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



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

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



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

R^1 representa H o un alquilo;

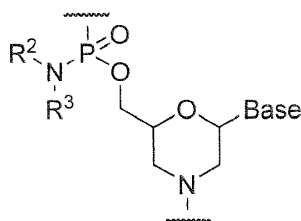
R^2 y R^3 , que pueden ser iguales o diferentes, representa cada uno H, un alquilo, un cicloalquilo o un arilo;

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

Y_2 representa O, S o NR^1 ;

Z representa O o S.

Preferiblemente, el oligómero morfolino es un oligómero que comprende una unidad constituyente representada por la siguiente fórmula general (oligómero fosforodiamidato morfolino (a partir de ahora mencionado como "PMO")).



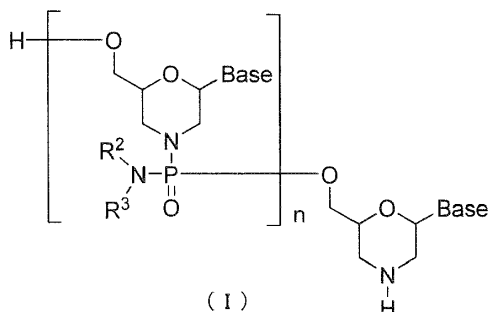
10

en donde Base R^2 y R^3 tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

El oligómero morfolino puede producirse de acuerdo con, por ejemplo, el documento WO 1991/009033 o documento WO 2009/064471. En particular, puede producirse PMO mediante el procedimiento descrito en el documento WO 2009/064471 o puede producirse mediante el proceso mostrado a continuación.

15 [Método para producir PMO]

Una realización de PMO es, por ejemplo, el compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) (a partir de ahora en ese documento PMO (I))



20

en donde Base, R^2 y R^3 tienen el mismo significado que el definido anteriormente; y, n es un número entero dado de 1 a 99, preferiblemente un número entero dado de 18 a 28.

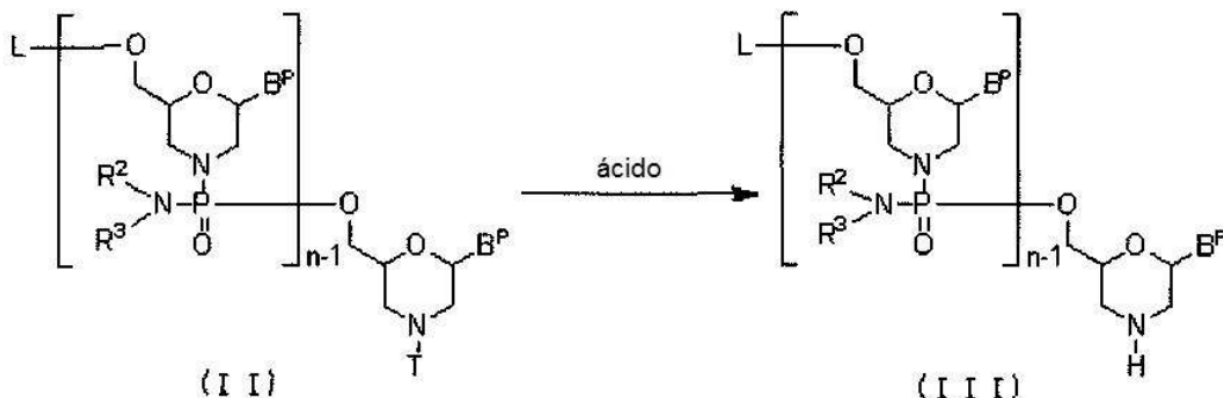
PMO (I) puede producirse de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, puede producirse realizando los procedimientos en las siguientes etapas.

Los compuestos y reactivos usados en las siguientes etapas no se limitan particularmente siempre que se usen habitualmente para preparar PMO.

Además, las siguientes etapas pueden realizarse todas por el método en fase líquida o el método en fase sólida (usando manuales o sintetizadores automatizados en fase sólida disponibles en el mercado). En la producción de PMO por el método de fase sólida, se desea usar sintetizadores automatizados en vista de procedimientos simples de operación y síntesis precisa.

5 (1) Etapa A:

El compuesto representado por la siguiente fórmula general (II) (a partir de ahora mencionado como compuesto (II)) se hace reaccionar con un ácido para preparar el compuesto representado por la siguiente fórmula general (III) (a partir de ahora mencionado como compuesto (III)):

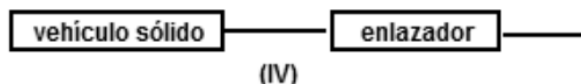


10 en donde n, R² y R³ tienen el mismo significado que el definido anteriormente;

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

T representa tritilo, monometoxitritilo o dimetoxitritilo; y,

L representa hidrógeno, un acilo o un grupo representado por la siguiente fórmula general (IV) (mencionado a partir de ahora en este documento como grupo (IV)).



15 La "nucleobase" para B^P incluye la misma "nucleobase" que en Base, con la condición de que el grupo amino o hidroxilo en la nucleobase mostrado por B^P pueda protegerse.

20 Dicho grupo protector para amino no está particularmente limitado siempre que se use como grupo protector para ácidos nucleicos. Ejemplos específicos incluyen benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo y (dimetilamino)metileno. Ejemplos específicos del grupo protector para el grupo hidroxilo incluyen 2-cianoetilo, 4-nitrofenetilo, fenilsulfonietilo, metilsulfonietilo y trimetilsilietilo, y fenilo, que puede estar sustituido por 1 a 5 grupos de extracción de electrones en posiciones sustituibles opcionales, difenilcarbamoilo, dimetilcarbamoilo, dietilcarbamoilo, metilfenilcarbamoilo, 1-pirrolidinilcarbamoilo, morfolinocarbamilo, 4-(terc-butylcarboxi)bencilo, 4-[(dimetilamino)carboxi]bencilo y 4-(fenilcarboxi)bencilo, (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/064471).

25 El "vehículo sólido" no está particularmente limitado siempre que sea un vehículo útil para la reacción en fase sólida de ácidos nucleicos. Se desea que el vehículo sólido tenga las siguientes propiedades: por ejemplo, (i) sea apenas soluble en reactivos que pueden usarse para la síntesis de derivados de ácido morfolinonucleico (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, N-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético); (ii) sea químicamente estable a los reactivos que se pueden usar para la síntesis de derivados de ácido morfolinonucleico; (iii) pueda modificarse químicamente; (iv) pueda cargarse con derivados deseados de ácido morfolinonucleico; (v) tenga una fuerza suficiente para resistir alta presión a través de los tratamientos; y (vi) tenga un intervalo y distribución uniformes de diámetro de partículas. Específicamente, poliestireno hinchable (por ejemplo, resina de aminometilpoliestireno reticulado con dibencilbenceno al 1 % (malla 200-400) (2,4-3,0 mmol/g) (fabricado por Tokyo Chemical Industry), Resina de Poliestireno Aminometilado HCl [dibencilbenceno al 1 %, malla 100-200] (fabricado por Peptide Institute, Inc.), poliestireno no hinchable (por ejemplo, Primer Support (fabricado por GE Healthcare)), poliestireno unido a cadena de PEG (por ejemplo, resina de NH₂-PEG (fabricado por Watanabe Chemical Co.), resina TentaGel), vidrio de poro controlado (vidrio de poro controlado; CPG) (fabricado por, por ejemplo, CPG), vidrio de poro controlado con oxalilo (véase, por ejemplo, Alul *et al.*, Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), TentaGel support-
30 soporte derivatizado con aminopoli(etilenglicol) (por ejemplo, Wright *et al.*, véase, Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), y un copolímero de Poros-poliestireno/divinilbenceno.

Un "enlazador" que puede usarse es un enlazador conocido generalmente usado para conectar ácidos nucleicos o derivados de ácido morfolinonucleico. Ejemplos incluyen 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dietanolsulfonilo y un alquilamino de cadena larga (LCAA).

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

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

10 Puede usarse 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 usada está apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 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 usa una sal o mezcla del ácido y la amina orgánica en esta etapa, la sal o mezcla incluye, por ejemplo, una sal o mezcla de ácido trifluoroacético y trietilamina, y más específicamente, una mezcla de 1 equivalente de trietilamina y 2 equivalentes de ácido trifluoroacético.

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

20 La temperatura de reacción en la reacción descrita anteriormente está preferiblemente en un intervalo de, por ejemplo, 10 °C a 50 °C, más preferiblemente en un intervalo de 20 °C a 40 °C, y mucho más preferiblemente, en un intervalo de 25 °C a 35 °C.

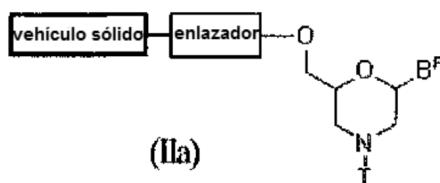
25 El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo del ácido usado y la temperatura de reacción, y está apropiadamente en un intervalo de 0,1 minutos a 24 horas en general, y preferiblemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

Después de completarse esta etapa, puede añadirse una base, si fuera necesario, para neutralizar el ácido que queda en el sistema. La "base" no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, diisopropilamina. La base también puede usarse en forma de una dilución con un disolvente apropiado en una concentración del 0,1 % (v/v) al 30 % (v/v).

30 El disolvente usado en esta etapa no está particularmente limitado siempre que sea inerte a la reacción, incluye diclorometano, acetonitrilo un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua y una mezcla de los mismos. La temperatura de reacción esta preferiblemente en un intervalo de por ejemplo, 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 la base usada y 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.

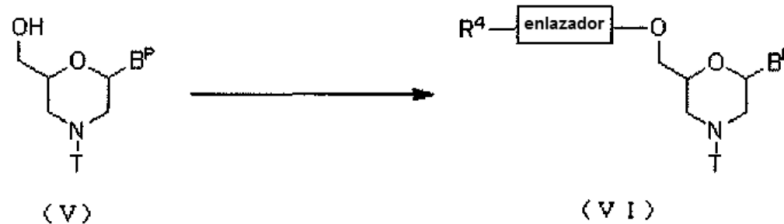
En el Compuesto (II), el compuesto de la siguiente fórmula general (IIa) (a partir de ahora en este documento compuesto (IIa)), donde n es 1 y L es un grupo (IV), puede producirse por el siguiente procedimiento.



en la que B^P, T, enlazador y vehículo sólido tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

40 Etapa 1:

El compuesto representado por la siguiente fórmula general (V) se hace reaccionar con un agente de acilación para preparar el compuesto representado por la siguiente fórmula general (VI) (a partir de ahora en este documento mencionado como Compuesto (VI)).

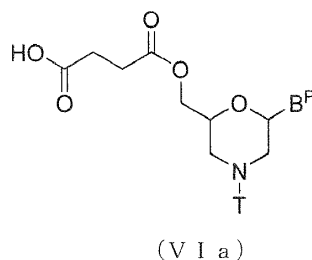


en donde B^P, T, y enlazador tienen el mismo significado que el definido anteriormente; y,

R⁴ representa hidroxilo, un halógeno o amino.

5 Esta etapa puede realizarse por procedimientos conocidos para introducir enlazadores, usando el Compuesto (V) como material de partida.

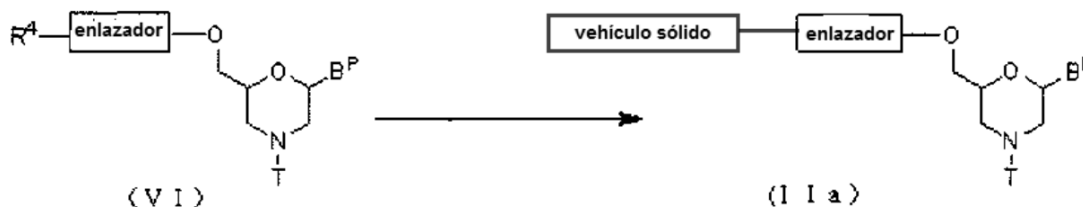
En particular, el compuesto representado por la siguiente fórmula general (VIa) puede producirse realizando el método conocido como esterificación, usando el Compuesto (V) y anhídrido succínico.



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

10 Etapa 2:

El compuesto (VI) se hace reaccionar con un vehículo sólido mediante un agente de condensación para preparar el Compuesto (IIa).

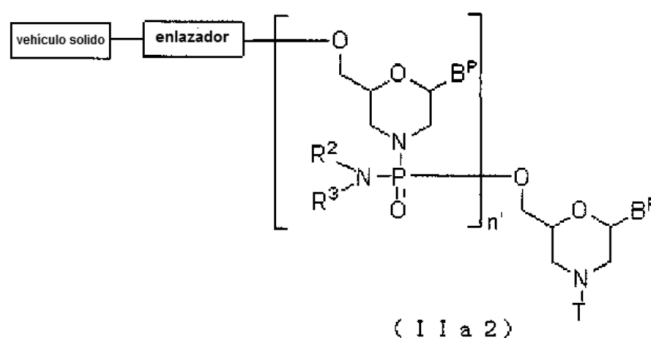


en donde B^P, R⁴, T, enlazador y vehículo sólido tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

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

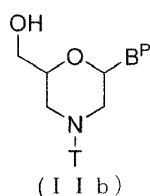
En el Compuesto (II), el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIa2) donde n es 2 a 99 y L es un grupo representado por la fórmula general (IV) puede producirse usando el Compuesto (IIa) como material de partida y repitiendo la etapa A y etapa B del método de producción de PMO descrito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

20



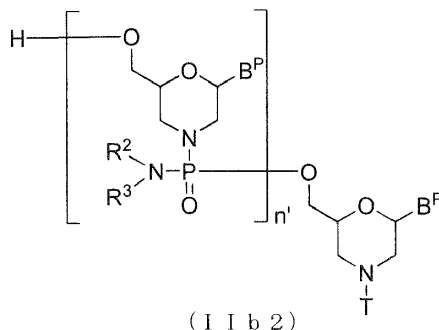
en donde B^P, R², R³, T, enlazador y vehículo sólido tienen el mismo significado que el definido anteriormente; y, n' representa de 1 a 98.

5 En el Compuesto (II), el compuesto de la siguiente fórmula general (IIb) en donde n es 1 y L es hidrógeno puede producirse por el procedimiento descrito en, por ejemplo, el documento WO 1991/009033.



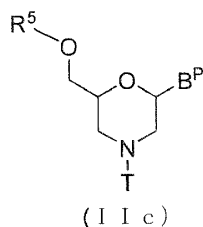
en donde B^P y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

10 En el Compuesto (II), el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIb2) donde n es de 2 a 99 y L es hidrógeno puede producirse usando el Compuesto (IIb) como material de partida y repitiendo la etapa A y etapa B del método de producción de PMO descrito en la memoria descriptiva una cantidad deseada de veces.



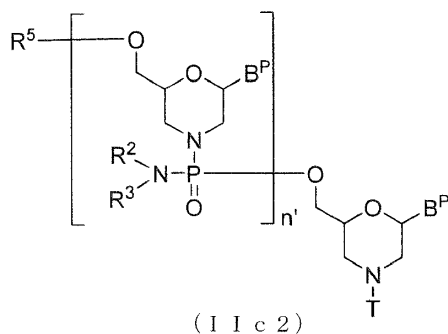
en donde B^P, n', R², R³ y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

En el Compuesto (II), el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIc) donde n es 1 y L es un acilo puede producirse realizando el procedimiento conocido como reacción de acilación, usando el Compuesto (IIb).



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

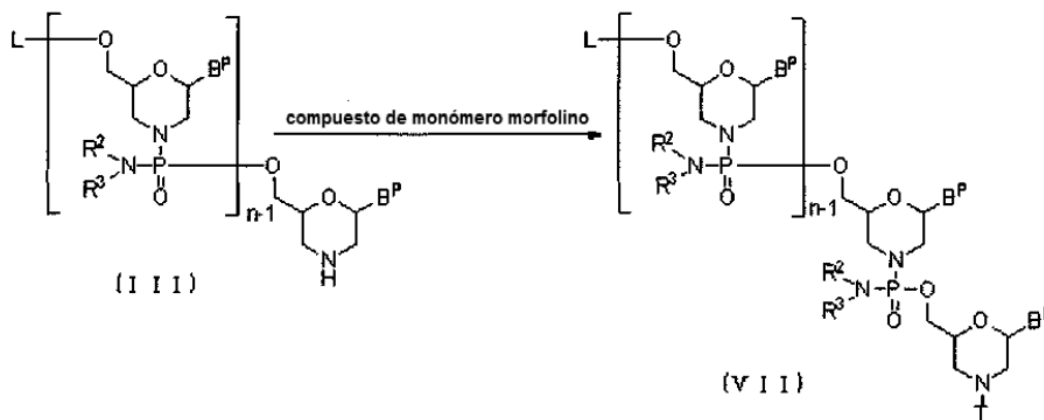
20 En el Compuesto (II), el compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIc2) donde n es 2 a 99 y L es un acilo puede producirse usando el Compuesto (IIc) como material de partida y repitiendo la etapa A y etapa B del método de producción de PMO descrito en la memoria descriptiva una cantidad deseada de veces.



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

(2) Etapa B

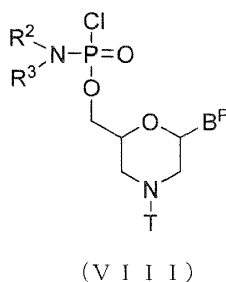
- 5 El Compuesto (III) se hace reaccionar con un compuesto de monómero morfolino en presencia de una base para preparar el compuesto representado por la siguiente fórmula general (VII) (a partir de ahora en este documento mencionado como Compuesto (VII)):



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

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

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



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

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

- 20 El compuesto de monómero morfolino y la base que puede usarse en esta etapa también pueden usarse como dilución con un disolvente apropiado en una concentración del 0,1 % al 30 %. El disolvente no está particularmente limitado en la medida en que sea inerte a 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, por ejemplo, 0 °C a 100 °C, y más preferiblemente, en un intervalo de 10 °C a 50 °C.

El tiempo de reacción puede variar dependiendo del tipo de la base usada 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.

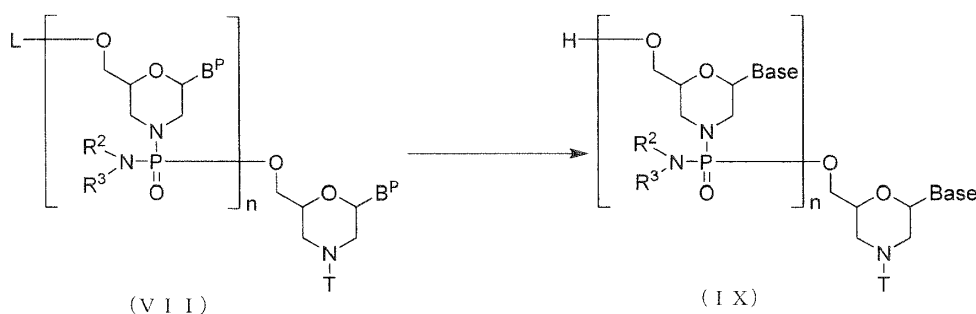
Además, después de completarse esta etapa, puede añadirse un agente de acilación, si fuera necesario. El "agente de acilación" incluye, por ejemplo, anhídrido acético, cloruro de acetilo y anhídrido fenoxiacético. El agente de acilación también puede usarse como dilución con un disolvente apropiado en una concentración del 0,1 % al 30 %. El disolvente no está limitado particularmente en la medida en que sea inerte a la reacción, e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, un(os) alcohol(es) (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua, o una mezcla de los mismos.

Si fuera necesario, también puede usarse una base tal como piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropiltilamina, *N*-etilmorfolina, etc., en combinación con el agente de acilación. La cantidad del agente de acilación está aproximadamente 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, por ejemplo, 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 de agente de acilación.

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 del agente de acilación usado 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:

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



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

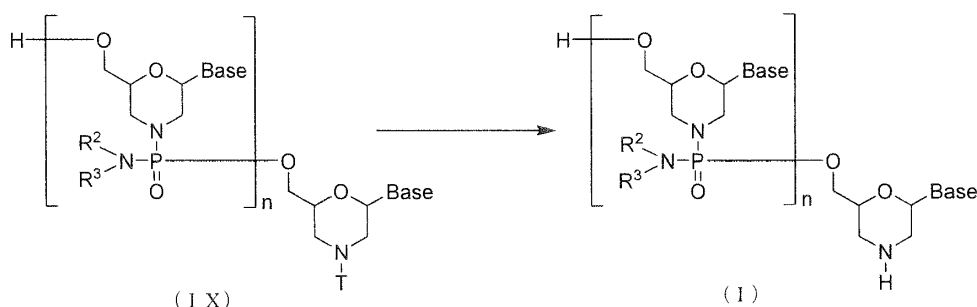
Esta etapa puede realizarse haciendo reaccionar el Compuesto (VII) con un agente de desprotección.

El "agente de desprotección" incluye, por ejemplo, agua con amoníaco concentrado y metilamina. El "agente de desprotección" usado en esta etapa también puede usarse como dilución con, por ejemplo, agua, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, DMF, *N,N*-dimetilimidazolidona, *N*-metilpiperidona, o una mezcla de estos disolventes. Entre otros, se prefiere etanol. La cantidad del agente de desprotección usada está apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 1 equivalente molar a 100000 equivalentes molares, y preferiblemente en un intervalo de 10 equivalentes molares a 1000 equivalentes molares, en base a 1 mol de compuesto (VII).

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.

(4) Etapa D:

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



en donde Base, n, R², R³ y T tienen el mismo significado que el definido anteriormente.

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

5 El "ácido" que puede usarse en esta etapa incluye, por ejemplo, ácido tricloroacético, ácido dicloroacético, ácido acético, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, etc. El ácido usado se usa apropiadamente para permitir que la solución tengo un intervalo de pH de 0,1 a 4,0, y más preferiblemente, en un intervalo de pH de 1,0 a 3,0. El disolvente no está particularmente limitado en la medida en que sea inerte a la reacción, e incluye, por ejemplo, acetonitrilo, agua, o una mezcla de estos disolventes de los mismos.

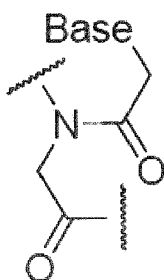
10 La temperatura de reacción está apropiadamente en un intervalo de 10 °C a 50 °C, preferiblemente, en un intervalo de 20 °C a 40 °C, y más preferiblemente, en un intervalo de 25 °C a 35 °C. El tiempo de reacción para la desprotección puede variar dependiendo del tipo de Compuesto (IX), la temperatura 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 PMO (I) puede obtenerse sometiendo la mezcla de reacción obtenida en esta etapa a medios convencionales de separación y purificación tales como extracción, concentración, neutralización, filtración, separación por centrifugación, recristalización, cromatografía en columna de fase inversa C₈ a C₁₈, cromatografía en columna de intercambio catiónico, cromatografía en columna de intercambio aniónico, cromatografía en columna de filtración en gel, cromatografía líquida de alta eficacia, diálisis, ultrafiltración, etc., en solitario o en combinación de los mismos. Por tanto, el PMO (I) deseado puede aislarse y purificarse (véase, por ejemplo, el documento WO 1991/09033).

20 En la purificación de PMO (I) usando cromatografía en fase inversa puede usarse, por ejemplo, una mezcla en solución de trietilamina 20 mM/tampón acetato y acetonitrilo como disolvente de elución.

En la purificación de PMO (I) usando cromatografía de intercambio iónico puede usarse, por ejemplo, una mezcla en solución de solución salina 1 M y solución acuosa de hidróxido sódico 10 mM como disolvente de elución.

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



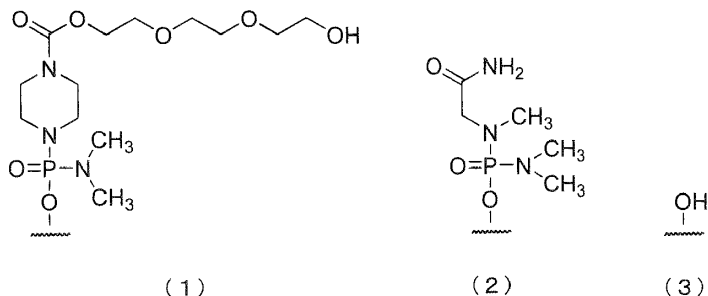
en donde Base tiene el mismo significado que el definido anteriormente.

Los ácidos peptidonucleicos pueden prepararse por referencia a, por ejemplo, los siguientes documentos.

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

5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K. Otteson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997)

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



5 A partir de ahora en este documento, los grupos mostrados por (1), (2) y (3) anteriores se mencionan como "Grupo (1)", "Grupo (2)" y "Grupo (3)," respectivamente.

2. Composición farmacéutica

10 El oligómero de la presente invención causa salto del exón 53 con una eficacia mayor en comparación con los oligómeros antisentido de la técnica anterior. Por tanto, se espera que puedan aliviarse afecciones de distrofia muscular con alta eficacia administrando la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención a pacientes con DMD. Por ejemplo, cuando se usa la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención, pueden conseguirse los mismos efectos terapéuticos incluso en una dosis más pequeña que la de los oligómeros de la técnica anterior. Por consiguiente, pueden aliviarse efectos secundarios y ello es económico.

15 En otra realización, la presente invención proporciona la composición farmacéutica para el tratamiento de distrofia muscular, que comprende como principio activo el oligómero de la presente invención, una sal o hidrato farmacéuticamente aceptable del mismo (a partir de ahora en este documento mencionado como "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 de metales tales como sales de aluminio, hierro, zinc, cobre, níquel, cobalto, etc.; sales de amonio; sales de amina orgánica tales como sales de t-octilamina, dibencilamina, morfolina, glucosamina, éster de alquilo de fenilglicina, etilendiamina, N-metilglucamina, guanidina, dietilamina, trietilamina, dicitohexilamina, N,N-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, procaína, dietanolamina, N-bencilfenetilamina, piperazina, tetrametilamonio, tris(hidroxiometil)aminometano; sales de hidroháluro tales como sales de fluorhidratos, clorhidratos, bromhidratos y yodhidratos; sales de ácidos inorgánicos tales como nitratos, percloratos, sulfatos, fosfatos, etc.; sulfonatos de alcano inferior tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; arilsulfonatos tales como bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartratos, oxalatos, maleatos, etc.; y, sales de aminoácidos tales como sales de glicina, lisina, arginina, ornitina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estas sales pueden producirse por métodos conocidos. Como alternativa, 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 limitada particularmente siempre que sea una vía farmacéuticamente aceptable para administración, y puede elegirse dependiendo del método de tratamiento. En vista de la facilidad en el suministro a tejidos musculares, se prefiere administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración oral, administración al tejido, administración transdérmica, etc. Además, las formas de dosificación que están disponibles para la composición de la presente invención no están particularmente limitadas, e incluyen, por ejemplo, diversas inyecciones, agentes orales, gotas, inhalaciones, pomadas, lociones, etc.

40 En la administración del oligómero de la presente invención a pacientes con distrofia muscular, la composición de la presente invención preferiblemente contiene un vehículo para promover el suministro del oligómero a tejidos musculares. Dicho vehículo no está particularmente limitado en la medida en que sea farmacéuticamente aceptable, y ejemplos incluyen vehículos catiónicos tales como liposomas catiónicos, polímeros catiónicos, etc., o vehículos que usan envuelta vírica. Los liposomas catiónicos son, por ejemplo, liposomas compuestos por 2-O-(2-dietilaminoetil)carbamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y fosfolípidos como constituyentes esenciales (a partir de ahora en este documento mencionados como "liposoma A"), Oligofectamine (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), Lipofectin (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), Lipofectamine (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), Lipofectamine 2000 (marca registrada) (fabricada por Invitrogen Corp.), DMRIE-C (marca registrada) (fabricada 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 liposoma A. Ejemplos de polímeros catiónicos son JetSI (marca registrada) (fabricado por Qbíogene, Inc.) y Jet-PEI (marca registrada) (polietilenimina, fabricado por Qbiogene, Inc.). Un ejemplo de vehículos que usan envuelta vírica es GenomeOne (marca registrada) (liposoma HVJ-E, fabricado por Ishihara Sangyo). Como alternativa, los dispositivos médicos descritos en la patente japonesa n.º 2924179 y los vehículos catiónicos descritos en las re-publicaciones locales de Japón de PCT n.º 2006/129594 y 2008/096690 pueden usarse también.

Una concentración del oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención puede variar dependiendo del tipo de vehículo, 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 ponderal del oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención y el vehículo (vehículo/oligómero de la presente invención) puede variar dependiendo de la propiedad del oligómero, el tipo de vehículo, 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.

Además del oligómero de la presente invención y el vehículo descrito anteriormente, también pueden formularse opcionalmente aditivos farmacéuticamente aceptables en la composición de la presente invención. Ejemplos de dichos aditivos son auxiliares de emulsificación (por ejemplo, ácidos grasos que tienen de 6 a 22 átomos de carbono y sus sales farmacéuticamente aceptables, albúmina y dextrano), estabilizantes (por ejemplo, colesterol y ácido fosfatídico), agente de isotonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa), y agentes de control del pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido sódico, hidróxido potásico y trietanolamina). Puede usarse uno o más de estos aditivos. El contenido del aditivo en la composición de la presente invención es apropiadamente del 90 % en peso o menos, preferiblemente del 70 % en peso o menos y más preferiblemente, del 50 % en peso o menos.

La composición de la presente invención puede prepararse añadiendo el oligómero de la presente invención a una dispersión de vehículo y agitando adecuadamente la mezcla. Pueden añadirse aditivos en una etapa apropiada antes o después de la adición del oligómero de la presente invención. Un disolvente acuoso que puede usarse al añadir el oligómero de la presente invención no está limitado particularmente en la medida en que sea farmacéuticamente aceptable, y ejemplos son agua inyectable o agua destilada inyectable, fluido de electrolitos tal como solución salina fisiológica, etc., y fluido de azúcar tal como fluido de glucosa, fluido de maltosa, etc. Un experto en la materia puede elegir apropiadamente las condiciones para pH y temperatura para dicha materia.

La composición de la presente invención puede prepararse en, por ejemplo, una forma líquida y su preparación liofilizada. La preparación liofilizada puede prepararse liofilizando la composición de la presente invención en forma líquida de un modo convencional. La liofilización puede realizarse, por ejemplo, esterilizando apropiadamente la composición de la presente invención en forma líquida, distribuyendo una alícuota en un recipiente de vial, realizando congelación preliminar durante 2 horas a condiciones de aproximadamente -40 °C a -20 °C, realizando un secado primario a de 0 a 10 °C a presión reducida, y después realizando un secado secundario a aproximadamente de 15 a 25 °C a presión reducida. En general, la preparación liofilizada de la composición de la presente invención puede obtenerse reemplazando el contenido del vial con gas nitrógeno y tapándolo.

La preparación liofilizada de la composición de la presente invención puede usarse, en general, tras la reconstitución, añadiendo una solución adecuada opcional (líquido de reconstitución) y volviendo a disolver la preparación. Dicho líquido de reconstitución incluye agua inyectable, solución salina fisiológica y otros fluidos de infusión. Un volumen del líquido de reconstitución puede variar dependiendo del uso pretendido, etc., no está particularmente limitado, y es adecuadamente de 0,5 a 2 veces mayor el volumen antes de la liofilización y de no más de 500 ml.

Se desea controlar una dosis de la composición de la presente invención que va a administrarse, teniendo en cuenta los siguientes factores: el tipo y forma de dosificación del oligómero de la presente invención contenido; las condiciones del paciente incluyendo edad, peso corporal, etc.; vía de administración; y las características y grado 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/ser humano, y preferiblemente de 1 mg a 1 g/ser humano. Este intervalo numérico puede variar ocasionalmente dependiendo del tipo de la enfermedad diana, la vía de administración y la molécula diana. Por lo tanto, una dosis inferior al intervalo puede ser suficiente en alguna ocasión y, por el contrario, puede requerirse una dosis superior al intervalo ocasionalmente. La composición puede administrarse desde una hasta varias veces al día o a intervalos desde un día hasta varios días.

En todavía otra realización de la composición de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector capaz de expresar el oligonucleótido de la presente invención y el vehículo descrito anteriormente. Dicho vector de expresión puede ser un vector capaz de expresar una pluralidad de los oligonucleótidos de la presente invención. La composición puede formularse con aditivos farmacéuticamente aceptables como en el caso de 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 vehículo, 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 ponderal del vector de expresión contenido en la composición y el vehículo (vehículo/vector de expresión) puede variar dependiendo de la propiedad del vector de

expresión, el tipo de vehículo, 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 vehículo 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 la misma también es igual que en el caso de la composición de la presente invención.

- 5 A partir de ahora en este documento, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos y Ejemplos de ensayo, pero no debe considerarse limitada a los mismos.

[Ejemplos]

[Ejemplo de referencia 1]

- 10 Ácido 4- $\{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi\}$ -4-oxobutanoico cargado en resina de aminometilpoliestireno

Etapa 1: Producción de

Ácido 4- $\{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi\}$ -4-oxobutanoico

- 15 En una atmósfera de argón, se suspendieron 22,0 g de *N*- $\{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il\}$ benzamida y 7,04 g de 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) en 269 ml de diclorometano, y se añadieron 5,76 g de anhídrido succínico a la suspensión, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. A la solución de reacción se añadieron 40 ml de metanol, y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo usando acetato de etilo y solución acuosa de dihidrogenofosfato de potasio 0,5 M. La fase orgánica resultante se lavó secuencialmente con solución acuosa de dihidrogenofosfato de potasio 0,5 M, agua y salmuera en el orden mencionado. La fase orgánica resultante se secó sobre sulfato sódico y se concentró a presión reducida para dar 25,9 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 aminometilpoliestireno

- 25 Después de disolver 23,5 g de ácido 4- $\{[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi\}$ -4-oxobutanoico en 336 ml de piridina (deshidratada), se añadieron 4,28 g de 4-DMAP y 40,3 g de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a la solución. Después, se añadieron 25,0 g de resina de aminometilpoliestireno reticulada con DVB al 1 % (fabricada por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., A 1543) y 24 ml de trietilamina a la mezcla, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 4 días. Después de completarse la reacción, la resina se recogió 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 150 ml de tetrahydrofurano (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 recogió por filtración, se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano en el orden mencionado, y se secó a presión reducida para dar 33,7 g del producto.
- 30

- 35 La cantidad de carga del producto se determinó midiendo la absorbancia de UV a 409 nm de la cantidad molar de tritilo por g de resina usando un método conocido. La cantidad de carga se la resina fue de 397,4 $\mu\text{mol/g}$.

Condiciones de medición de UV

Dispositivo: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Disolvente: ácido metanosulfónico

Longitud de onda: 265 nm

- 40 Valor ϵ : 45000

[Ejemplo de referencia 2]

Ácido 4-oxo-4- $\{[(2S,6R)-6-(6-oxo-2-[2-fenoxiacetamido]-1H-purin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi\}$ butanoico cargado en resina de 2-aminometilpoliestireno

Etapa 1: Producción de N^2 -(fenoxiacetil)guanosina

- 45 Se secaron 100 g de guanosina a 80 °C a presión reducida durante 24 horas. Después se añadieron 500 ml de piridina (anhidra) y 500 ml de diclorometano (anhidro) a la misma, se añadieron gota a gota 401 ml de clorotrimetilsilano a la mezcla en una atmósfera de argón a 0 °C, seguido por agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La mezcla se enfrió de nuevo en hielo y se añadieron gota a gota 66,3 g de cloruro de fenoxiacetilo a la misma. Con enfriamiento con hielo, la mezcla se agitó durante 3 horas adicionales. A la solución de reacción se añadieron 500 ml de metanol,

y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente después se retiró por destilación a presión reducida. Al residuo se añadieron 500 ml de metanol, y se realizó concentración a presión reducida 3 veces. Al residuo se añadieron 4 l de agua, y la mezcla se agitó durante una hora en enfriamiento con hielo. Los precipitados formados se recogieron por filtración, se lavaron secuencialmente con agua y metanol frío y después se secaron para dar 150,2 g del compuesto objetivo (rendimiento: 102 %) (véase: Org. Lett. (2004), Vol. 6, n.° 15, 2555-2557).

Etapa 2:

p-Toluensulfonato de *N*-{9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-morfolin-2-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il}-2-fenoxiacetamida

En 480 ml de metanol se suspendieron 30 g del compuesto obtenido en la Etapa 1, y se añadieron 130 ml de ácido clorhídrico 2 N a la suspensión en enfriamiento con hielo. Posteriormente, se añadieron 56,8 g de tetraborato de amonio tetrahidratado y 16,2 g de peryodato sódico a la mezcla en el orden mencionado y se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de reacción se enfrió en hielo y se retiró la materia insoluble por filtración, seguido por lavado con 100 ml de metanol. El filtrado y el líquido de lavado se combinaron y la mezcla se enfrió en hielo. A la mezcla se añadieron 11,52 g de 2-picolina-borano. Después de agitar durante 20 minutos, se añadieron lentamente 54,6 g de ácido p-toluensulfónico monohidratado a la mezcla, seguido por agitación a 4 °C durante la noche. Los precipitados se recogieron 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 %).

¹H RMN (δ, DMSO-d₆): 9,9-9,2 (2H, a), 8,35 (1H, s), 7,55 (2H, m), 7,35 (2H, m), 7,10 (2H, d, J=7,82 Hz), 7,00 (3H, m), 5,95 (1H, dd, J=10,64, 2,42 Hz), 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-{9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il}-2-fenoxiacetamida

En 30 ml de diclorometano se suspendieron 2,0 g del compuesto obtenido en la Etapa 2, y se añadieron 13,9 g de trietilamina y 18,3 g de cloruro de tritilo a la suspensión en enfriamiento con hielo. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora. La solución de reacción se lavó con solución acuosa saturada de bicarbonato sódico y después con agua, y se secó. La fase orgánica se concentró a presión reducida. Al residuo se añadieron 40 ml de tampón citrato sódico 0,2 M (pH 3)/metanol (1:4 (v/v)), y se agitó la mezcla. Posteriormente, se añadieron 40 ml de agua y la mezcla se agitó durante una hora en enfriamiento con hielo. La mezcla se recogió por filtración, se lavó con metanol frío y se secó para dar 1,84 g del compuesto objetivo (rendimiento: 82,0 %).

Etapa 4: Producción de

Ácido 4-oxo-4-[[[(2S,6R)-6-(6-oxo-2-[2-fenoxiacetamido]-1H-purin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]butanoico cargado en resina de aminometilpoliestireno

El compuesto del título se produjo de un modo similar al Ejemplo de referencia 1, excepto que se usó *N*-{9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-6-oxo-6,9-dihidro-1H-purin-2-il}-2-fenoxiacetamida en esta etapa, en lugar de *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]

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 aminometilpoliestireno

El compuesto del título se produjo de un modo similar al Ejemplo de referencia 1, excepto que se usó 1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidina-2,4(1H,3H)-diona en esta etapa, en lugar de *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]

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

El compuesto del título se produjo de un modo similar al Ejemplo de referencia 1, excepto que se usó ácido 2-[2-(2-hidroxietoxietoxi)etil 4-tritilpiperazin-1-carboxílico (el compuesto descrito en el documento WO 2009/064471) en esta etapa, en lugar de *N*-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida.

De acuerdo con las descripciones de los Ejemplos 1 a 12 y los Ejemplos de referencia 1 a 3 a continuación, se sintetizaron diversos tipos de PMO mostrados por los PMO n.° 1-11 y 13-16 en la Tabla 2. El PMO sintetizado se disolvió en agua inyectable (fabricada por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.). El PMO n.° 12 se adquirió de Gene Tools, LLC.

Tabla 2

PMO n.º	Secuencia diana en el exón 53	Nota	SEQ ID NO:
1	31 - 55	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 4
2	32 - 53	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 8
3	32 - 56	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 11
4	33 - 54	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 15
5	34 - 58	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 25
6	36 - 53	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 32
7	36 - 55	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 34
8	36 - 56	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 35
9	36-57	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 36
10	33-57	extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 18
11	39-69	Secuencia correspondiente a H53A(+39+69) (véase la Tabla 1) en el documento no de patente 3, extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 38
12	30-59	Secuencia correspondiente a h53A30/1 (véase la Tabla 1) en el documento no de patente 5, extremo 5': grupo (2)	SEQ ID NO: 39
13	32 - 56	extremo 5': grupo (1)	SEQ ID NO: 11
14	36 - 56	extremo 5': grupo (1)	SEQ ID NO: 35
15	30-59	Secuencia correspondiente a h53A30/1 (véase la Tabla 1) en el documento no de patente 5, extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 39
16	23-47	Secuencia correspondiente a SEQ ID NO: 429 descrita en el documento de patente 4, extremo 5': grupo (3)	SEQ ID NO: 47

[Ejemplo 1]

PMO n.º 8

5 Se transfirió ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico, cargado en resina de aminometilpoliestireno (Ejemplo de referencia 1), 2 g (800 mmol) a un vaso de reacción, y se añadieron 30 ml de diclorometano al mismo. La mezcla se dejó reposar durante 30 minutos. Después de que la mezcla se lavara adicionalmente dos veces con 30 ml de diclorometano, se inició el siguiente ciclo de síntesis. Se añadió el compuesto de monómero morfolino deseado en cada ciclo para dar la secuencia de nucleótidos del compuesto del título.

10

Tabla 3

Etapa	Reactivo	Volumen (ml)	Tiempo (min)
-------	----------	--------------	--------------

ES 2 750 748 T3

1	solución de desbloqueo	30	2,0
2	solución de desbloqueo	30	2,0
3	solución de desbloqueo	30	2,0
4	solución de desbloqueo	30	2,0
5	solución de desbloqueo	30	2,0
6	solución de desbloqueo	30	2,0
7	solución neutralizante	30	1,5
8	solución neutralizante	30	1,5
9	solución neutralizante	30	1,5
10	solución neutralizante	30	1,5
11	solución neutralizante	30	1,5
12	solución neutralizante	30	1,5
13	diclorometano	30	0,5
14	diclorometano	30	0,5
15	diclorometano	30	0,5
16	solución de acoplamiento B	20	0,5
17	solución de acoplamiento A	6 - 11	90,0
18	diclorometano	30	0,5
19	diclorometano	30	0,5
20	diclorometano	30	0,5
21	solución de sellado	30	3,0
22	solución de sellado	30	3,0
23	diclorometano	30	0,5

ES 2 750 748 T3

24	diclorometano	30	0,5
25	diclorometano	30	0,5

- La solución de desbloqueo usada fue una solución obtenida disolviendo una mezcla de ácido trifluoroacético (2 equivalentes) y trietilamina (1 equivalente) en una solución de diclorometano que contenía etanol al 1% (v/v) y 2,2,2-trifluoroetanol al 10 % (v/v) para que estuviera al 3 % (p/v). La solución neutralizante usada fue una solución obtenida disolviendo N,N-diisopropiletilamina en una solución de diclorometano que contenía 2-propanol al 25 % (v/v) para que estuviera al 5 % (v/v). La solución de acoplamiento A usada fue una solución obtenida disolviendo el compuesto de monómero morfolino en 1,3-dimetil-2-imidazolidinona que contenía N,N-diisopropiletilamina al 10 % (v/v) para que estuviera a 0,15 M. La solución de acoplamiento B usada fue una solución obtenida disolviendo N,N-diisopropiletilamina en 1,3-dimetil-2-imidazolidinona para que estuviera al 10 % (v/v). La solución de sellado usada fue una solución obtenida disolviendo anhídrido acético al 20 % (v/v) y 2,6-lutidina al 30 % (v/v) en diclorometano.
- La resina de aminometilpoliestireno cargada con el PMO sintetizado anteriormente se recuperó del vaso de reacción y se secó a temperatura ambiente durante al menos 2 horas a presión reducida. El PMO secado cargado en resina de aminometilpoliestireno se cargó en un vaso de reacción, y se añadieron 200 ml de agua con amoniaco al 28 % - etanol (1/4) al mismo. La mezcla se agitó a 55 °C durante 15 horas. La resina de aminometilpoliestireno se separó por filtración y se lavó con 50 ml de agua-etanol (1/4). El filtrado resultante se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 100 ml de una mezcla de disolventes de ácido acético 20 mM-tampón trietilamina (tampón TEAA) y acetonitrilo (4/1) y se filtró a través de un filtro de membrana. El filtrado obtenido se purificó por HPLC en fase inversa. Las condiciones usadas son las siguientes.

Tabla 4

Columna	XTerra MS18 (Waters, ϕ 50 x 100 mm, 1 CV = 200 ml)
Caudal	60 ml/min
Temperatura de la columna	temperatura ambiente
Solución A	tampón TEAA 20 mM
Solución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 20→50 %/9 CV

- Cada fracción se analizó y se recuperó el producto en 100 ml de acetonitrilo-agua (1/1), al cual se añadieron 200 ml de etanol. La mezcla se concentró a presión reducida. El secado adicional a presión reducida dio un sólido blanco. Al sólido resultante se añadieron 300 ml de solución acuosa de ácido fosfórico 10 mM para suspender el sólido. A la suspensión se añadieron 10 ml de solución acuosa de ácido fosfórico 2 M y la mezcla se agitó durante 15 minutos. Además, se añadieron 15 ml de solución acuosa de hidrato sódico 2 M para neutralización. Después, se añadieron 15 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 2 M para hacer la mezcla alcalina, seguido por filtración a través de un filtro de membrana (0,45 μ m). La mezcla se lavó minuciosamente con 100 ml de solución acuosa de hidróxido sódico 10 mM para dar el producto como solución acuosa.

La solución acuosa resultante que contenía el producto se purificó por columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones usadas son las siguientes.

Tabla 5

Columna	Source 30Q (GE Healthcare, ϕ 40 x 150 mm, 1 CV = 200 ml)
Caudal	80 ml/min
Temperatura de columna	temperatura ambiente

ES 2 750 748 T3

Solución A	solución acuosa de hidróxido sódico 10 mM
Solución B	solución acuosa de hidróxido sódico 10 mM, solución acuosa de cloruro sódico 1 M
Gradiente	(B) conc. 5→35 %/15 CV

Cada fracción se analizó (en HPLC) y se obtuvo el producto como solución acuosa. A la solución acuosa resultante se añadieron 225 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0) para neutralización. La mezcla se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm). A continuación, se realizó ultrafiltración en las condiciones descritas a continuación.

Tabla 6

Filtro	PELLICON2 MINI FILTER PLBC 3K Celulosa Regenerada, Tamiz Tipo C
Tamaño	0,1 m ²

- 5 El filtrado se concentró para dar aproximadamente 250 ml de una solución acuosa. La solución acuosa resultante se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm). La solución acuosa obtenida se liofilizó para dar 1,5 g del compuesto objetivo como sólido tipo algodón blanco.

EM-IEN-TOF Calculado: 6924,82

Encontrado: 6923,54

- 10 [Ejemplo 2]

PMO, n.º 1

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

EM-MALDI-TOF Calculado: 8291,96

Encontrado: 8296,24

- 15 [Ejemplo 3]

PMO, n.º 2

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

EM-IEN-TOF Calculado: 7310,13

Encontrado: 7309,23

- 20 [Ejemplo 4]

PMO, n.º 3

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

EM-IEN-TOF Calculado: 8270,94

Encontrado: 8270,55

- 25 [Ejemplo 5]

PMO, n.º 4

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

- 30 EM-IEN-TOF Calculado: 7310,13

Encontrado: 7310,17

[Ejemplo 6]

PMO. n.º 5

5 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, excepto que se usó 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 aminometilpoliestireno (Ejemplo de referencia 3) como material de partida.

EM-IEN-TOF Calculado: 8270,94

Encontrado: 8270,20

[Ejemplo 7]

PMO. n.º 6

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

EM-IEN-TOF Calculado: 5964,01

Encontrado: 5963,68

[Ejemplo 8]

PMO. n.º 7

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

EM-IEN-TOF Calculado: 6609,55

Encontrado: 6608,85

[Ejemplo 9]

PMO. n.º 9

20 El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, excepto que se usó ácido 4-oxo-4-(((2S,6R)-6-(6-oxo-2-(2-fenoxiacetamido)-1H-purin-9(6H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)butanoico cargado en resina de aminometilpoliestireno (Ejemplo de referencia 2) como material de partida.

EM-IEN-TOF Calculado: 7280,11

Encontrado: 7279,42

25 [Ejemplo 10]

PMO. n.º 10

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1, excepto que se usó ácido 4-oxo-4-(((2S,6R)-6-(6-oxo-2-(2-fenoxiacetamido)-1H-purin-9(6H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il)metoxi)butanoico cargado en resina de aminometilpoliestireno (Ejemplo de referencia 2) como material de partida.

30 EM-IEN-TOF Calculado: 8295,95

Encontrado: 8295,91

[Ejemplo 11]

PMO. n.º 13

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

EM-IEN-TOF Calculado: 7276,15

Encontrado: 7276,69

[Ejemplo 12]

40 PMO. n.º 14

ES 2 750 748 T3

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

EM-IEN-TOF Calculado: 8622,27

5 Encontrado: 8622,29

[Ejemplo comparativo 1]

PMO: n.º 11

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

EM-IEN-TOF Calculado: 10274,63

10 Encontrado: 10273,71

[Ejemplo comparativo 2]

PMO: n.º 15

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

EM-IEN-TOF Calculado: 9941,33

15 Encontrado: 9940,77

[Ejemplo comparativo 3]

PMO: n.º 16

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

EM-IEN-TOF Calculado: 8238,94

20 Encontrado: 8238,69

[Ejemplo de ensayo 1]

Ensayo *in vitro*

25 Usando un kit Amaxa Cell Une Nucleofector L sobre Nucleofector II (Lonza), se transfectaron 10 µM de los oligómeros PMO n.ºs 1 a 8 de la presente invención y el oligómero antisentido PMO n.º 11 con 4 x 10⁵ células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano). Se usó el programa T-030.

30 Después de la transfección, las células se cultivaron durante la noche en 2 ml de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (fabricado por Sigma, a partir de ahora en este documento igual) que contenía suero fetal de ternero (FCS) al 10 % (fabricado por Invitrogen) en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células se lavaron dos veces con PBS (fabricado por Nissui, a partir de ahora en este documento igual) y se añadieron 500 µl de ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) en las células. Después de dejar reposar las células a temperatura ambiente durante unos pocos minutos para lisar las células, el lisado se recogió en un tubo Eppendorf. El ARN total se extrajo de acuerdo con el protocolo adjunto a ISOGEN. La concentración del ARN total extraído se determinó usando un NanoDrop ND-1000 (fabricado por LMS).

35 Se realizó RT-PCR de una etapa con 400 ng del ARN total extraído usando un kit de RT-PCR Titan One Tube (fabricado por Roche). Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se usó un PTC-100 (fabricado por MJ Research) como termociclador. El programa de RT-PCR usando es el siguiente.

50 °C, 30 min: transcripción inversa

94 °C, 2 min: desnaturalización térmica

[94 °C, 10 segundos; 58 °C, 30 segundos; 68 °C, 45 segundos] x 30 ciclos: amplificación por PCR

40 68 °C, 7 minutos: extensión final

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

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

ES 2 750 748 T3

Cebador inverso: 5'-GTCTGCCACTGGCGGAGGTC-3' (SEQ ID NO: 41)

A continuación, se realizó una PCR anidada con el producto amplificado por RT-PCR anterior usando una ADN polimerasa Taq (fabricada por Roche). El programa de PCR usado es el siguiente.

94 °C, 2 min: desnaturalización térmica

5 [94 °C, 15 segundos; 58 °C, 30 segundos; 68 °C, 45 segundos] x 30 ciclos: amplificación por PCR

68 °C, 7 minutos: extensión final

Las secuencias de nucleótidos del cebador directo y el cebador inversos usados para la PCR anidada anterior se dan a continuación.

Cebador directo: 5'-CATCAAGCAGAAGGCAACAA-3' (SEQ ID NO: 42)

10 Cebador inverso: 5'-GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (SEQ ID NO: 43)

El producto de reacción, 1 µl, de la PCR anidada anterior se analizó usando un Bioanalyzer (fabricado por Agilent Technologies, Inc.).

15 Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con salto del exón 53 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin salto del exón 53. Basándose en estos valores de medición de "A" y "B", se determinó la eficacia de salto mediante la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

20 Los resultados se muestran en la FIG. 1. Éste experimento reveló que los oligómeros PMO n.ºs 1 a 8 de la presente invención causaban salto del exón 53 con una eficacia marcadamente elevada en comparación con el oligómero antisentido PMO n.º 11. En particular, los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 y de la presente invención mostraron eficacia de salto de exón cuatro veces mayor que la del oligómero antisentido PMO n.º 11.

[Ejemplo de ensayo 2]

Ensayo *in vitro* usando fibroblastos humanos

25 Se introdujo el gen myoD humano (SEQ ID NO: 44) en células TIG-119 (fibroblastos derivados de tejido normal humano, National Institute of Biomedical Innovation) o células 5017 (fibroblastos derivados de pacientes con DMD humana, Coriell Institute for Medical Research) usando un vector retroviral de coexpresión ZsGreen1.

30 Después de incubación durante de 4 a 5 días, los fibroblastos transformados con MyoD ZsGreen positivos se recogieron por FACS y se sembraron a $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ en una placa de 12 pocillos. Como medio de cultivo, se usó un 1 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco: mezcla nutriente F-12 (DMEM.F-12) (Invitrogen Corp.) que contenía FCS al 10 % y Penicilina al 1 %/Estreptomina (P/S) (Sigma-Aldrich, Inc.).

El medio se reemplazó 24 horas después por medio de diferenciación (DMEM/F-12 que contenía suero equino al 2 % (Invitrogen Corp.), P/S al 1 % y suplemento de medio líquido ITS (Sigma, Inc.)). El medio se intercambió cada 2 a 3 días y se continuó la incubación durante de 12 a 14 días para diferenciar en miotubos.

35 Posteriormente, se reemplazó el medio de diferenciación por un medio de diferenciación que contenía EndoPorter 6 µM (Gene Tools), y se añadió el oligómero morfolino al mismo en una concentración final de 10 µM. Después de incubación durante 48 horas, se extrajo el ARN total de las células usando TRIzol (fabricado por Invitrogen Corp.). Se realizó RT-PCR con 50 ng de ARN total extraído usando un kit de RT-PCR QIAGEN OneStep. Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se usó un iCycler (fabricado por Bio-Rad) como termociclador. El programa de RT-PCR usado es el siguiente.

40 50 °C, 30 minutos: transcripción inversa

95 °C, 15 minutos: desnaturalización térmica

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

72 °C, 7 minutos: extensión final

Los cebadores usados fueron hEX51F y hEX55R.

45 hEX51F: 5'-CGGGCTTGGACAGAACTTAC-3' (SEQ ID NO: 45)

hEx55R: 5'-TCCTTACGGGTAGCATCCTG-3' (SEQ ID NO: 46)

5 El producto de reacción de RT-PCR anterior se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se capturaron imágenes del gel con un GeneFlash (Syngene). Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con salto del exón 53 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin salto del exón 53 usando un instrumento Image J (fabricado por National Institutes of Health). Basándose en estos valores de medición de "A" y "B", se determinó la eficacia de salto mediante la siguiente ecuación.

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

Resultados experimentales

10 Los resultados se muestran en las FIG. 2 y 3. Este experimento reveló que en células TIG-119, los oligómeros PMO n.ºs 3, 8 y 9 de la presente invención (FIG. 2) causaban todos salto del exón 53 con eficacia mayor que el oligómero antisentido PMO n.º 12 (FIG. 2). En particular, los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 de la presente invención mostraron eficacia de salto de exón más de dos veces mayor que la del oligómero antisentido PMO n.º 12 (FIG. 2).

15 Además, este experimento reveló que los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 a 10 de la presente invención (FIG. 3) causaban todos salto del exón 53 con una eficacia mayor que el oligómero antisentido PMO n.º 12 (FIG. 3). En particular, los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 de la presente invención mostraron eficacia de salto del exón más de siete veces mayor que la del oligómero antisentido PMO n.º 12 (FIG. 3).

[Ejemplo de ensayo 3]

Ensayo *in vitro* usando fibroblastos humanos

20 Se estableció la línea celular de fibroblastos cutáneos (fibroblastos de pacientes con DMD humana (exones 45-52 o exones 48-52) por biopsia del antebrazo izquierdo medio de pacientes con DMD con delección de los exones 45-52 o pacientes con DMD con delección de los exones 48-52. Se introdujo el gen myoD humano (SEQ ID NO: 44) en las células fibroblásticas usando un vector retroviral de coexpresión ZsGreen1.

25 Después de incubación durante de 4 a 5 días, se recogieron fibroblastos transformados con MyoD ZsGreen-positivos por FACS y se sembraron a $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ en una placa de 12 pocillos. Como medio de cultivo, se usó 1 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco: mezcla nutriente F-12 (DMEM/F-12) (Invitrogen Corp.) que contenía FCS al 10 % y Penicilina al 1 %/Estreptomina (P/S) (Sigma-Aldrich, Inc.).

El medio se reemplazó 24 horas después por un medio de diferenciación (DMEM/F-12 que contenía suero equino al 2 % (Invitrogen Corp.), P/S al 1 % y suplemento de medio líquido ITS (Sigma, Inc.)). El medio se intercambió cada de 2 a 3 días y se continuó la incubación durante 12, 14 o 20 días para diferenciar en miotubos.

30 Posteriormente, se reemplazó el medio de diferenciación por un medio de diferenciación que contenía EndoPorter 6 μM (Gene Tools), y se añadió un oligómero morfolino al mismo a una concentración final de 10 μM . Después de incubación durante 48 horas, se extrajo el ARN total de las células usando un TRIzol (fabricado por Invitrogen Corp.). Se realizó RT-PCR con 50 ng del ARN total extraído usando un kit de RT-PCR QIAGEN OneStep. Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se usó un iCycler (fabricado por Bio-Rad) como termociclador. El programa de RT-PCR usado es el siguiente.

50 °C, 30 minutos: transcripción inversa

95 °C, 15 minutos: desnaturalización térmica

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

72 °C, 7 minutos: extensión final

40 Los cebadores usados fueron hEx44F y h55R.

hEx44F: 5'-TGTTGAGAAATGGCGGCGT-3' (SEQ ID NO: 48)

hEx55R: 5'-TCCTTACGGGTAGCATCCTG-3' (SEQ ID NO: 46)

45 El producto de reacción de RT-PCR anterior se separó por electroforesis en gel de agarosa al 2 % y se capturaron imágenes del gel con un GeneFlash (Syngene). Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con salto del exón 53 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin salto del exón 53 usando un instrumento Image J (fabricado por National Institutes of Health). Basándose en estos valores de medición de "A" y "B", se determinó la eficacia de salto mediante la siguiente ecuación.

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

Resultados experimentales

Los resultados se muestran en las FIG. 4 y 5. Este experimento reveló que los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 de la presente invención causaban salto del exón 53 con una eficacia tan alta como más del 80 % en las células de pacientes con DMD con delección de los exones 45-52 (FIG. 4) o delección de los exones 48-52 (FIG. 5). Además, los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 de la presente invención se descubrió que causaban salto del exón 53 con una eficacia mayor que la del oligómero antisentido PMO n.º 15 en las células de pacientes con DMD con delección de los exones 45-52 (FIG. 4).

[Ejemplo de ensayo 4]

Transferencia de Western

Se añadió el oligómero PMO n.º 8 de la presente invención a las células a una concentración de 10 µM, y se extrajeron proteínas de las células después de 72 horas usando un tampón RIPA (fabricado por Thermo Fisher Scientific) que contenía Complete Mini (fabricado por Roche Applied Science) y se cuantificaron usando un kit de ensayo de proteína BCA (fabricado por Thermo Fisher Scientific). Las proteínas se sometieron a electroforesis en gel de Tris-Acetato al 3-8 % NuPAGE Novex (fabricado por Invitrogen) a 150 V durante 75 minutos y se transfirieron a una membrana de PVDF (fabricada por Millipore) usando un secante semiseco. La membrana de PVDF se bloqueó con un agente de bloqueo ECL al 5 % (fabricado por GE Healthcare) y la membrana después se incubó en una solución de anticuerpo antidistrofina (fabricado por NCL-Dys1, Novocastra). Después de incubación adicional en una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (Modelo n.º 170-6516, Bio-Rad), se tiñó la membrana con sistema de transferencia de Western ECL Plus (fabricado por GE Healthcare).

Inmunotinción

El oligómero PMO n.º 3 u 8 de la presente invención se añadió a las células. Las células, después de 72 horas se fijaron en paraformaldehído al 30 % durante 10 minutos, seguido por incubación en Triton-X al 10 % durante 10 minutos. Después de bloquear en PBS que contenía suero de cabra al 10 %, la membrana se incubó en una solución de anticuerpo antidistrofina (NCL-Dys1, Novocastra). La membrana se incubó adicionalmente en una solución de anticuerpo anti-IgG de ratón (fabricado por Invitrogen). La membrana se montó con reactivo Pro Long Gold Antifade (fabricado por Invitrogen) y se observó con un microscopio de fluorescencia.

Resultados experimentales

Los resultados se muestran en las FIG. 6 y 7. En este experimento se confirmó por transferencia de Western (FIG. 6) e inmunotinción (FIG. 7) que los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 de la presente invención inducían la expresión de la proteína distrofina.

[Ejemplo de ensayo 5]

Ensayo *in vitro* usando fibroblastos humanos

El experimento se realizó como en el Ejemplo de ensayo 3.

Resultados experimentales

Los resultados se muestran en la FIG. 8. Este experimento reveló que en las células de pacientes con DMD con delección de los exones 45-52, los oligómeros PMO n.ºs 3 a 8 de la presente invención causaban salto del exón 53 con una eficacia mayor que los oligómeros n.ºs 13 y 14 de la presente invención (FIG. 8).

[Ejemplo de ensayo 6]

Ensayo *in vitro*

Se realizaron experimentos usando los oligómeros antisentido de 2'-O-metoxi-fosforotioatos (2'-OMe-S-ARN) mostrados por las SEQ ID NO: 49 a SEQ ID NO: 123. Se adquirieron diversos oligómeros antisentido usados para el ensayo de Japan Bio Services. Las secuencias de diversos oligómeros antisentido se dan a continuación.

Tabla 7

Oligómero antisentido	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
H53_39-69	CAUUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG	49
H53_1-25	UCCCACUGAUUCUGAAUUCUUUCA	50
H53_6-30	CUUCAUCCCACUGAUUCUGAAUUCU	51

ES 2 750 748 T3

H53_11-35	UUGUACUUCAUCCCACUGAUUCUGA	52
H53_16-40	UGUUCUUGUACUUCAUCCCACUGAU	53
H53_21-45	GAAGGUGUUCUUGUACUUCAUCCCA	54
H53_26-50	GUUCUGAAGGUGUUCUUGUACUUCA	55
H53_31-55	CUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUGUA	56
H53_36-60	GUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUC	57
H53_41-65	CAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGG	58
H53_46-70	UCAUUAACUGUUGCCUCCGGUUCU	59
H53_51-75	ACAUUUAUUAACUGUUGCCUCCG	60
H53_56-80	CUUUAACAUUUAUUAACUGUUGC	61
H53_61-85	GAAUCCUUUAACAUUUAUUAACU	62
H53_66-90	GUGUUGAAUCCUUUAACAUUUAU	63
H53_71-95	CCAUUGUGUUGAAUCCUUUAACAU	64
H53_76-100	UCCAGCCAUUGUGUUGAAUCCUUUA	65
H53_81-105	UAGCUUCCAGCCAUUGUGUUGAAUC	66
H53_86-110	UUCCUAGCUUCCAGCCAUUGUGUU	67
H53_91-115	GCUUCUCCUAGCUUCCAGCCAUU	68
H53_96-120	GCUCAGCUUCUCCUAGCUUCCAG	69
H53_101-125	GACCUGCUCAGCUUCUCCUAGCU	70
H53_106-130	CCUAAGACCUGCUCAGCUUCUCCU	71
H53_111-135	CCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUC	72
H53_116-140	UCUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCA	73
H53_121-145	UUGGCUCUGGCCUGUCCUAAGACCU	74
H53_126-150	CAAGCUUGGCUCUGGCCUGUCCUAA	75
H53_131-155	UGACUCAAGCUUGGCUCUGGCCUGU	76
H53_136-160	UCCAUGACUCAAGCUUGGCUCUGG	77

ES 2 750 748 T3

H53_141-165	CCUCCUCCAUGACUCAAGCUUGGC	78
H53_146-170	GGGACCCUCCUCCAUGACUCAAGC	79
H53_151-175	GUAUAGGGACCCUCCUCCAUGACU	80
H53_156-180	CUACUGUAUAGGGACCCUCCUCCA	81
H53_161-185	UGCAUCUACUGUAUAGGGACCCUCC	82
H53_166-190	UGGAUUGCAUCUACUGUAUAGGGAC	83
H53_171-195	UCUUUUGGAUUGCAUCUACUGUAUA	84
H53_176-200	GAUUUUCUUUUGGAUUGCAUCUACU	85
H53_181-205	UCUGUGAUUUUCUUUUGGAUUGCAU	86
H53_186-210	UGGUUUCUGUGAUUUUCUUUUGGAU	87
H53_84-108	CCUUAGCUUCCAGCCAUUGUGUUGA	88
H53_88-112	UCUCCUUAGCUUCCAGCCAUUGUG	89
H53_119-143	GGCUCUGGCCUGUCCUAAGACCUGC	90
H53_124-148	AGCUUGGCUCUGGCCUGUCCUAAGA	91
H53_128-152	CUCAAGCUUGGCUCUGGCCUGUCCU	92
H53_144-168	GACCCUCCUCCAUGACUCAAGCUU	93
H53_149-173	AUAGGGACCCUCCUCCAUGACUCA	94
H53_153-177	CUGUAUAGGGACCCUCCUCCAUGA	95
H53_179-203	UGUGAUUUUCUUUUGGAUUGCAUCU	96
H53_184-208	GUUUCUGUGAUUUUCUUUUGGAUUG	97
H53_188-212	CUUGGUUUCUGUGAUUUUCUUUUGG	98
H53_29-53	CCGGUUCUGAAGGUGUUCUUGUACU	99
H53_30-54	UCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUGUAC	100
H53_32-56	CCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUGU	101
H53_33-57	GCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUG	102
H53_34-58	UGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCU	103

ES 2 750 748 T3

H53_35-59	UUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCU	104
H53_37-61	UGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUU	105
H53_38-62	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGU	106
H53_39-63	ACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG	107
H53_40-64	AACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGU	108
H53_32-61	UGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUGUUCUUGU	109
H53_32-51	GGUUCUGAAGGUGUUCUUGU	110
H53_35-54	UCCGGUUCUGAAGGUGUUCU	111
H53_37-56	CCUCCGGUUCUGAAGGUGUU	112
H53_40-59	UUGCCUCCGGUUCUGAAGGU	113
H53_42-61	UGUUGCCUCCGGUUCUGAAG	114
H53_32-49	UUCUGAAGGUGUUCUUGU	115
H53_35-52	CGGUUCUGAAGGUGUUCU	116
H53_38-55	CUCCGGUUCUGAAGGUGU	117
H53_41-58	UGCCUCCGGUUCUGAAGG	118
H53_44-61	UGUUGCCUCCGGUUCUGA	119
H53_35-49	UUCUGAAGGUGUUCU	120
H53_40-54	UCCGGUUCUGAAGGU	121
H53_45-59	UUGCCUCCGGUUCUG	122
H53_45-62	CUGUUGCCUCCGGUUCUG	123

Se sembraron células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano) a 3×10^5 en una placa de 6 pocillos y se cultivaron en 2 ml de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (fabricado por Sigma, Inc., a partir de ahora en este documento igual) que contenía suero fetal de ternero (FCS) al 10 % (fabricado por Invitrogen Corp.) en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 % durante la noche. Se prepararon complejos de diversos oligómeros antisentido (Japan Bio Services) (1 µM) para salto del exón 53 y Lipofectamine 2000 (fabricado por Invitrogen Corp.) y se añadieron 200 µl a células RD donde se intercambié 1,8 ml del medio, para alcanzar la concentración final de 100 nM.

5

Después de completarse la adición, las células se cultivaron durante la noche. Las células se lavaron dos veces con PBS (fabricado por Nissui, a partir de ahora en este documento igual) y después se añadieron 500 µl de ISOGEN (fabricado por Nippon Gene) a las células. Después de dejar reposar las células a temperatura ambiente durante unos pocos minutos para la lisis celular, el lisado se recogió en un tubo Eppendorf. Se extrajo el ARN total de acuerdo con el protocolo adjunto a ISOGEN. Se determinó la concentración del ARN total extraído usando un instrumento NanoDrop ND-1000 (fabricado por LMS).

10

ES 2 750 748 T3

Se realizó RT-PCR de una etapa con 400 ng del ARN total extraído usando un kit de RT-PCR Titan One Tube (fabricado por Roche). Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Se usó un PTC-100 (fabricado por MJ Research) como termociclador. El programa de RT-PCR usado es el siguiente.

50 °C, 30 minutos: transcripción inversa

5 94 °C, 2 minutos: desnaturalización térmica

[94 °C, 10 segundos; 58 °C, 30 segundos; 68 °C, 45 segundos] x 30 ciclos: amplificación por PCR

68 °C, 7 minutos: extensión final

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

Cebador directo: 5'-CATCAAGCAGAAGGCAACAA-3' (SEQ ID NO: 42)

10 Cebador inverso: 5'-GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (SEQ ID NO: 43)

Posteriormente, se realizó una PCR anidada con el producto amplificado de RT-PCR anterior usando una ADN polimerasa Taq (fabricada por Roche). El programa de PCR usado es el siguiente.

94 °C, 2 min: desnaturalización térmica

[94 °C, 15 segundos; 58 °C, 30 segundos; 68 °C, 45 segundos] x 30 ciclos: amplificación por PCR

15 68 °C, 7 minutos: extensión final

Las secuencias de nucleótidos del cebador directo y cebador inverso usados para la PCR anidada anterior se dan a continuación.

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

Cebador inverso: 5'-GTCTGCCACTGGCGGAGGTC-3' (SEQ ID NO: 41)

20 El producto de reacción, 1 µl, de la PCR anidada anterior se analizó usando un Bioanalyzer (fabricado por Agilent Technologies, Inc.).

Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con salto del exón 53 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin salto del exón 53. Basándose en estos valores de medición de "A" y "B", se determinó la eficacia de salto mediante la siguiente ecuación:

25
$$\text{Eficacia de salto (\%)} = A/(A + B) \times 100$$

Resultados experimentales

Los resultados se muestran en las FIG. 9 a 17. Estos experimentos revelaron que, cuando los oligómeros antisentido se diseñaban en las posiciones 31-61 desde el extremo 5' del exón 53 en el gen de la distrofina humana, se causa salto en el exón 53 con una alta eficacia.

30 [Ejemplo de ensayo 7]

Usando un kit L Amaxa Cell Line Nucleofector sobre Nucleofector II (Lonza), se transfectaron de 0,3 a 30 µM de los oligómeros antisentido con 3,5 x 10⁵ células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano). Se usó el programa T-030.

35 Después de la transfección, las células se cultivaron durante la noche en 2 ml de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (fabricado por Sigma, Inc., a partir de ahora en este documento igual) que contenía suero fetal de ternero (FCS) al 10 % (fabricado por Invitrogen Corp.) en condiciones de 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células se lavaron dos veces con PBS (fabricado por Nissui, a partir de ahora en este documento igual) y después se añadieron 500 µl de ISOGEN (fabricador por Nippon Gene) a las células. Después de dejar que las células reposaran a temperatura ambiente durante unos pocos minutos para lisar las células, el lisado se recogió en un tubo Eppendorf. Se extrajo el ARN total de acuerdo con el protocolo adjunto a ISOGEN. Se determinó la concentración del ARN total extraído usando un instrumento NanoDrop ND-1000 (fabricado por LMS).

40 Se realizó RT-PCR de una etapa con 400 ng del ARN total extraído usando un kit de RT-PCR QIAGEN OneStep (fabricado por Qiagen, Inc.). Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. El termociclador usado fue un PTC-100 (fabricado por MJ Research). El programa de RT-PCR usado es el siguiente.

45 50 °C, 30 minutos: transcripción inversa

95 °C, 15 minutos: desnaturalización térmica

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

72 °C, 10 minutos: extensión final

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

5 Cebador directo: 5'-CATCAAGCAGAAGGCAACAA-3' (SEQ ID NO: 42)

Cebador inverso: 5'-GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (SEQ ID NO: 43)

El producto de reacción, 1 µl, de la PCR anterior se analizó usando un Bioanalyzer (fabricado por Agilent Technologies, Inc.).

10 Se midieron el nivel de polinucleótido "A" de la banda con salto del exón 53 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda sin salto del exón 53. Basándose en estos valores de medición de "A" y "B", se determinó la eficacia de salto mediante la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

15 Los resultados se muestran en las FIG. 18 y 19. Estos experimentos revelaron que el oligómero PMO n.º 8 de la presente invención causaba salto del exón 53 con una eficacia marcadamente elevada en comparación con los oligómeros antisentido PMO n.ºs 15 y 16 (FIG. 18). También se reveló que los oligómeros PMO n.ºs 3 y 8 de la presente invención causaban salto del exón 53 con una eficacia marcadamente elevada en comparación con los oligómeros PMO n.ºs 13 y 14 de la presente invención (FIG: 19). Estos resultados mostraron que las secuencias con grupo -OH en el extremo 5' proporcionan una eficacia de salto mayor incluso en las mismas secuencias.

20 **Aplicabilidad industrial**

Los resultados experimentales en los Ejemplos de ensayo demuestran que los oligómeros de la presente invención (PMO n.ºs 1 a 10) causaban todos salto del exón 53 con una eficacia marcadamente elevada en todos los entornos celulares, en comparación con los oligómeros (PMO n.ºs 11, 12, 15 y 16) de acuerdo con la técnica anterior. Las células 5017 usadas en el Ejemplo de ensayo 2 son las células aisladas de pacientes con DMD y los fibroblastos usados en los Ejemplos de ensayo 3 y 5 son células diana de salto del exón 53 de pacientes con DMD. Particularmente, en los Ejemplos de ensayo 3 y 5, los oligómeros de la presente invención muestran eficacia de salto del exón 53 del 90 % o mayor en las células de pacientes con DMD que son la diana para el salto del exón 53. Por consiguiente, los oligómeros de la presente invención pueden inducir salto del exón 53 con una alta eficacia, cuando se administran a pacientes con DMD.

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

Texto libre de lista de secuencias

SEQ ID NO: 2: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 3: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 4: ácido nucleico sintético

35 SEQ ID NO: 5: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 6: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 7: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 8: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 9: ácido nucleico sintético

40 SEQ ID NO: 10: ácido nucleico sintético

SEQ ID NO: 11: ácido nucleico sintético

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
- SEQ ID NO: 17: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 18: ácido nucleico sintético
- 5 SEQ ID NO: 19: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 20: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 21: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 22: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 23: ácido nucleico sintético
- 10 SEQ ID NO: 24: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 25: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 26: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 27: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 28: ácido nucleico sintético
- 15 SEQ ID NO: 29: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 30: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 31: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 32: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 33: ácido nucleico sintético
- 20 SEQ ID NO: 34: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 35: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 36: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 37: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 38: ácido nucleico sintético
- 25 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
- 30 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
- 35 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
- SEQ ID NO: 55: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 56: ácido nucleico sintético
- 5 SEQ ID NO: 57: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 58: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 59: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 60: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 61: ácido nucleico sintético
- 10 SEQ ID NO: 62: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 63: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 64: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 65: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 66: ácido nucleico sintético
- 15 SEQ ID NO: 67: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 68: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 69: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 70: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 71: ácido nucleico sintético
- 20 SEQ ID NO: 72: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 73: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 74: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 75: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 76: ácido nucleico sintético
- 25 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
- 30 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
- 35 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
- SEQ ID NO: 92: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 93: ácido nucleico sintético
- 5 SEQ ID NO: 94: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 95: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 96: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 97: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 98: ácido nucleico sintético
- 10 SEQ ID NO: 99: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 100: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 101: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 102: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 103: ácido nucleico sintético
- 15 SEQ ID NO: 104: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 105: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 106: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 107: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 108: ácido nucleico sintético
- 20 SEQ ID NO: 109: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 110: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 111: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 112: ácido nucleico sintético
- SEQ ID NO: 113: ácido nucleico sintético
- 25 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
- 30 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
- SEQ ID NO: 123: ácido nucleico sintético

LISTADO DE SECUENCIAS

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

5 <120> ÁCIDO NUCLEICO ANTISENTIDO

<130> PCT11-0042

<150> JP 2010-196032

10 <151> 01-09-2010

<160> 123

15 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 212

<212> ADN

20 <213> Homo sapiens

<400> 1

ttgaaagaat tcagaatcag tgggatgaag tacaagaaca ccttcagaac cggaggcaac 60

agttgaatga aatgttaaag gattcaacac aatggctgga agctaaggaa gaagctgagc 120

aggtccttagg acaggccaga gccaaagcttg agtcatggaa ggagggtccc tatacagtag 180

atgcaatcca aaagaaaatc acagaaacca ag 212

25 <210> 2

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 2

35 ccggttctga aggtgttctt gta 23

<210> 3

<211> 24

<212> ADN

40 <213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

45 <400> 3

tccggttctg aaggtgttct tgta 24

<210> 4

<211> 25

50 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

55 <400> 4

ctccggttct gaaggtgttc tgta 25

<210> 5

60 <211> 26

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 5
 cctccgggtc tgaaggtgt cttgta 26

 10 <210> 6
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 6
 20 gcctccggtt ctgaaggtgt tcttgta 27

 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 7
 30 tgctccggt tctgaaggtg ttcttgta 28

 <210> 8
 <211> 22
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 8
 40 ccggttctga aggtgttct gt 22

 <210> 9
 <211> 23
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 50

 <400> 9
 tccggttctg aaggtgttct tgt 23

 <210> 10
 55 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 10
 ctccggttct gaaggtgttc ttgt 24

 65 <210> 11
 <211> 25

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 11
 cctccggttc tgaaggtgtt cttgt 25

 10 <210> 12
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 12
 20 gcctccggtt ctgaaggtgt tcttgt 26

 <210> 13
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 13
 30 tgctccggt tctgaaggtg ttctgt 27

 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 14
 40 ccggttctga aggtgttct g 21

 <210> 15
 <211> 22
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 50
 <400> 15
 tccggttctg aaggtgttct tg 22

 <210> 16
 55 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 16
 ctccggttct gaaggtgttc ttg 23

 65 <210> 17
 <211> 24

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 17
 cctccggttc tgaaggtgtt cttg 24

 10 <210> 18
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 18
 20 gcctccggtt ctgaaggtgt tcttg 25

 <210> 19
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 19
 30 tgctccggt tctgaaggtg ttcttg 26

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

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 20
 40 ccggttctga aggtgttct 20

 <210> 21
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 50
 <400> 21
 tccggttctg aaggtgttct t 21

 <210> 22
 55 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 22
 ctccggttct gaaggtgttc tt 22

 65 <210> 23
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 23
 cctccgggtc tgaaggtgtt ctt 23

 10 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 24
 20 gcctccggtt ctgaaggtgt tctt 24

 <210> 25
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 25
 30 tgctccggt tctgaaggtg ttctt 25

 <210> 26
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 26
 40 ccggttctga aggtgttct 19

 <210> 27
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 50
 <400> 27
 tccggttctg aaggtgttct 20

 <210> 28
 55 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 28
 ctccggttct gaaggtgttc t 21

 65 <210> 29
 <211> 22

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 29
 cctccgggtc tgaaggtgtt ct 22

 10 <210> 30
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 30
 20 gcctccggtt ctgaaggtgt tct 23

 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 31
 30 tgctccgggt tctgaaggtg ttct 24

 <210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 32
 40 ccggttctga aggtgttc 18

 <210> 33
 <211> 19
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 50
 <400> 33
 tccggttctg aaggtgttc 19

 <210> 34
 55 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 34
 ctccggttct gaaggtgttc 20

 65 <210> 35
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 35
 cctccggttc tgaaggtgt c 21

 10 <210> 36
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 36
 20 gcctccggtt ctgaaggtgt tc 22

 <210> 37
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 37
 30 tgctccggt tctgaaggtg ttc 23

 <210> 38
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 38
 40 cattcaactg ttgcctccgg ttctgaaggt g 31

 <210> 39
 <211> 30
 45 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 50
 <400> 39
 ttgcctccgg ttctgaaggt gttctgtac 30

 <210> 40
 55 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 60 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 40
 aggattgga acagaggcgt c 21

 65 <210> 41
 <211> 20

ES 2 750 748 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 41
 gtctgccact ggcggaggtc 20

 10 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

 15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 42
 20 catcaagcag aaggcaacaa 20

 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 43
 30 gaagtttcag ggccaagtca 20

 <210> 44
 <211> 963
 <212> ADN
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 44
 atggagctac tgtcggcacc gctccgcgac gtagacctga cggccccga cggctctctc 60
 tgctcctttg ccacaacgga cgacttctat gacgaccggt gtttcgactc cccggacctg 120
 cgcttcttcg aagacctgga cccgcgcctg atgcacgtgg gcgcgctcct gaaacccgaa 180
 gagcactogc acttccccgc ggcggtgcac ccggccccgg gcgcacgtga ggacgagcat 240
 gtgcgcgcgc ccagcgggca ccaccaggcg ggccgctgcc tactgtgggc ctgcaaggcg 300
 tgcaagcgca agaccaccaa cgccgaccgc cgcaaggccg ccaccatgcg cgagcggcgc 360
 cgcctgagca aagtaaatga ggcctttgag aactcaagc gctgcacgtc gagcaatcca 420
 aaccagcgggt tgcccaaggt ggagatcctg cgcaacgcca tccgctatat cgagggcctg 480
 caggctctgc tgcgcgacca ggacgcgcgc cccctggcg ccgcagccgc cttctatgcg 540
 ccgggccccg tgccccggg ccgcggcggc gagcactaca gggcgactc cgacgcgtcc 600
 agccccgcgt ccaactgctc cgacggcatg atggactaca gcgcccccc gagcggcgc 660
 cggcggcgga actgctacga aggcgcctac tacaacgagg cgcccagcga acccaggccc 720
 gggaagagtg cggcgggtgtc gaggcctagac tgctgtcca gcatcgtgga gcgcatctcc 780

ES 2 750 748 T3

```

accgagagcc ctgcggcgcc cgccctcctg ctggcggacg tgccttctga gtcgcctccg      840
cgcaggcaag aggctgccgc ccccagcgag ggagagagca gcggcgaccc caccagtca      900
ccggacgccg ccccgcagtg ccctgcgggt gcgaaccca acccgatata ccagtgctc      960
tga                                                                           963

<210> 45
<211> 20
5  <212> ADN
   <213> Artificial

<220>
<223> Ácido nucleico sintético

10 <400> 45
    cgggcttgga cagaactac           20

<210> 46
<211> 20
15 <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
20 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 46
    tccttacggg tagcatcctg         20

25 <210> 47
    <211> 25
    <212> ADN
    <213> Artificial

30 <220>
    <223> ADN sintético

<400> 47
35 ctgaaggtgt tctgtactt catcc       25

<210> 48
<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
    <223> ADN sintético

<400> 48
45 tgttgagaaa tggcggcgt           19

<210> 49
<211> 31
<212> ARN
50 <213> Artificial

<220>
<223> Ácido nucleico sintético

55 <400> 49
    cauucaacug uugccuccgg uucugaaggu g      31

<210> 50
<211> 25
60 <212> ARN

```


	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
5	<400> 50 ucccacugau ucugaaucu uucaa	25
	<210> 51	
10	<211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 51 cuucauccca cugauucuga auucu	25
20	<210> 52 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 52 uuguacuuca ucccacugau ucuga	25
30	<210> 53 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
	<400> 53 uguucuugua cuucauccca cugau	25
40	<210> 54 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
50	<400> 54 gaagguguuc uuguacuuca uccca	25
	<210> 55 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Ácido nucleico sintético	
60	<400> 55 guucugaagg uguucuugua cuuca	25
	<210> 56 <211> 25 <212> ARN	
65		

<213> Artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 5
 <400> 56
 cuccgguucu gaagguguuc uugua 25
 <210> 57
 10 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 15 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 57
 guugccuccg guucugaagg uguuc 25
 <210> 58
 20 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 58
 caacuguugc cuccgguucu gaagg 25
 <210> 59
 30 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 59
 40 ucauucacu guugccuccg guucu 25
 <210> 60
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 60
 50 acuuuacuu caacuguugc cuccg 25
 <210> 61
 <211> 25
 <212> ARN
 55 <213> Artificial
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 61
 60 cuuuacacu ucauucacu guugc 25
 <210> 62
 <211> 25
 65 <212> ARN
 <213> Artificial

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 62	gaaucuuua acauuacauu caacu	25
	<210> 63		
	<211> 25		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 63	guguugauc cuuuacauu ucáu	25
	<210> 64		
	<211> 25		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 64	ccauuguuu gaaucuuua acáu	25
	<210> 65		
	<211> 25		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
35	<400> 65	uccagccauu guguugauc cuua	25
	<210> 66		
	<211> 25		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
45	<400> 66	uagcuuccag ccauuguuu gaauc	25
50	<210> 67		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 67	uuccuagcu uccagccauu guguu	25
60	<210> 68		
	<211> 25		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 68
 gcuucuuccu uagcuuccag ccauu 25

10 <210> 69
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 69
 gcucagcuuc uuccuagcu uccag 25

20 <210> 70
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 70
 gaccugcuca gcuucuuccu uagcu 25

30 <210> 71
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 71
 ccuaagaccu gcucagcuuc uuccu 25

40 <210> 72
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 72
 ccuguccuaa gaccugcuca gcuuc 25

55 <210> 73
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 73
 ucuggccugu ccuaagaccu gcuca 25

65 <210> 74
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 74
 5 uggcucugg ccuguccuaa gaccu 25

 <210> 75
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 75
 15 caagcuuggc ucuggccugu ccuaa 25

 <210> 76
 <211> 25
 <212> ARN
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 76
 25 ugacucaagc uggcucugg ccugu 25

 <210> 77
 <211> 25
 <212> ARN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 77
 35 uucaugacu caagcuuggc ucugg 25

 <210> 78
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 78
 50 ccuccuucca ugacucaagc uuggc 25

 <210> 79
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 79
 60 gggaccucc uucaugacu caagc 25

 <210> 80
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 80
 5 guauaggac ccuccuucca ugacu 25

 <210> 81
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 81
 15 cuacuguaua gggaccucc uucca 25

 <210> 82
 <211> 25
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 25
 <400> 82
 ugcaucuacu guauaggac ccucc 25

 <210> 83
 <211> 25
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 35
 <400> 83
 uggauugcau cuacuguaua gggac 25

 <210> 84
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 84
 50 uuuuuggau ugcaucuacu guaua 25

 <210> 85
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 85
 60 gauuuuuuu uggauugcau cuacu 25

 <210> 86
 <211> 25
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 86	ucugugauuu ucuuuuggau ugcau	25
	<210> 87		
	<211> 25		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 87	ugguuucugu gauuuucuuu uggau	25
	<210> 88		
	<211> 25		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 88	ccuuagcuuc cagccauugu guuga	25
	<210> 89		
30	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 89	ucuuccuag cuuccagcca uugug	25
40	<210> 90		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 90	ggcucuggcc uguccuaaga ccugc	25
50	<210> 91		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 91	agcuuggcuc uggccugucc uaaga	25
60	<210> 92		
	<211> 25		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 92	cucaagcuug gcucuggccu guccu	25
	<210> 93		
	<211> 25		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 93	gaccuccuu ccaugacuca agcuu	25
	<210> 94		
	<211> 25		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 94	auagggaccc uccuuccaug acuca	25
	<210> 95		
	<211> 25		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
35	<400> 95	cuguauagg acccuccuuc cauga	25
	<210> 96		
	<211> 25		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
45	<400> 96	ugugauuuuc uuuuggauug caucu	25
50	<210> 97		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
60	<400> 97	guuucuguga uuuucuuuug gauug	25
	<210> 98		
	<211> 25		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 98	cuugguuucu gugauuuucu uuugg	25
	<210> 99		
	<211> 25		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 99	ccgguucuga agguuuucu guacu	25
	<210> 100		
	<211> 25		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 100	uccgguucug aagguuucu uguac	25
	<210> 101		
	<211> 25		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
35	<400> 101	ccuccgguuc ugaagguuu cuugu	25
	<210> 102		
	<211> 25		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 102	gccuccgguu cugaagguu ucuug	25
50	<210> 103		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 103	ugccuccggu ucugaagguu uucuu	25
60	<210> 104		
	<211> 25		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 104	uugccuccgg uucugaaggu guucu	25
	<210> 105		
	<211> 25		
10	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 105	uguugccucc gguucugaag guguu	25
	<210> 106		
	<211> 25		
20	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 106	cuguugccuc cgguucugaa ggugu	25
	<210> 107		
	<211> 25		
30	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
35	<400> 107	acuguugccu ccgguucuga aggug	25
	<210> 108		
	<211> 25		
40	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 108	aacuguugcc uccgguucug aaggu	25
50	<210> 109		
	<211> 30		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 109	uguugccucc gguucugaag guguucuugu	30
60	<210> 110		
	<211> 20		
	<212> ARN		
65	<213> Artificial		

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 110
 5 gguucugaag guguucuugu 20

 <210> 111
 <211> 20
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 111
 15 uccgguucug aagguguucu 20

 <210> 112
 <211> 20
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 25
 <400> 112
 ccuccgguuc ugaagguguu 20

 <210> 113
 <211> 20
 30 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 35
 <400> 113
 uugccuccgg uucugaaggu 20

 <210> 114
 <211> 20
 40 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 114
 50 uguugccucc gguucugaag 20

 <210> 115
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 115
 60 uucugaaggu guucuugu 18

 <210> 116
 <211> 18
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 116
 5 cgguucugaa gguguucu 18

 <210> 117
 <211> 18
 <212> ARN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 117
 15 cuccgguucu gaaggugu 18

 <210> 118
 <211> 18
 20 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 25
 <400> 118
 ugccuccggu ucugaagg 18

 <210> 119
 30 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 119
 uguugccucc gguucuga 18

 <210> 120
 40 <211> 15
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 120
 50 uucugaaggu guucu 15

 <210> 121
 <211> 15
 <212> ARN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 121
 60 uccgguucug aaggu 15

 <210> 122
 <211> 15
 <212> ARN
 65 <213> Artificial

ES 2 750 748 T3

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 122

5 uugccuccgg uucug 15

<210> 123

<211> 18

<212> ARN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 123

15 cuguugccuc cgguucug 18

REIVINDICACIONES

1. Un oligómero antisentido que causa salto del 53° exón en el gen de la distrofina humana, que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a nucleótidos del 36° al 60° desde el extremo 5' del 53° exón en el gen de la distrofina humana.
- 5 2. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, que es un oligonucleótido.
3. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el resto de azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido está modificado.
4. El oligómero antisentido de acuerdo con la reivindicación 3, 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 remplazado por uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en: OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br y I, en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquileo.
- 10

Figura 1

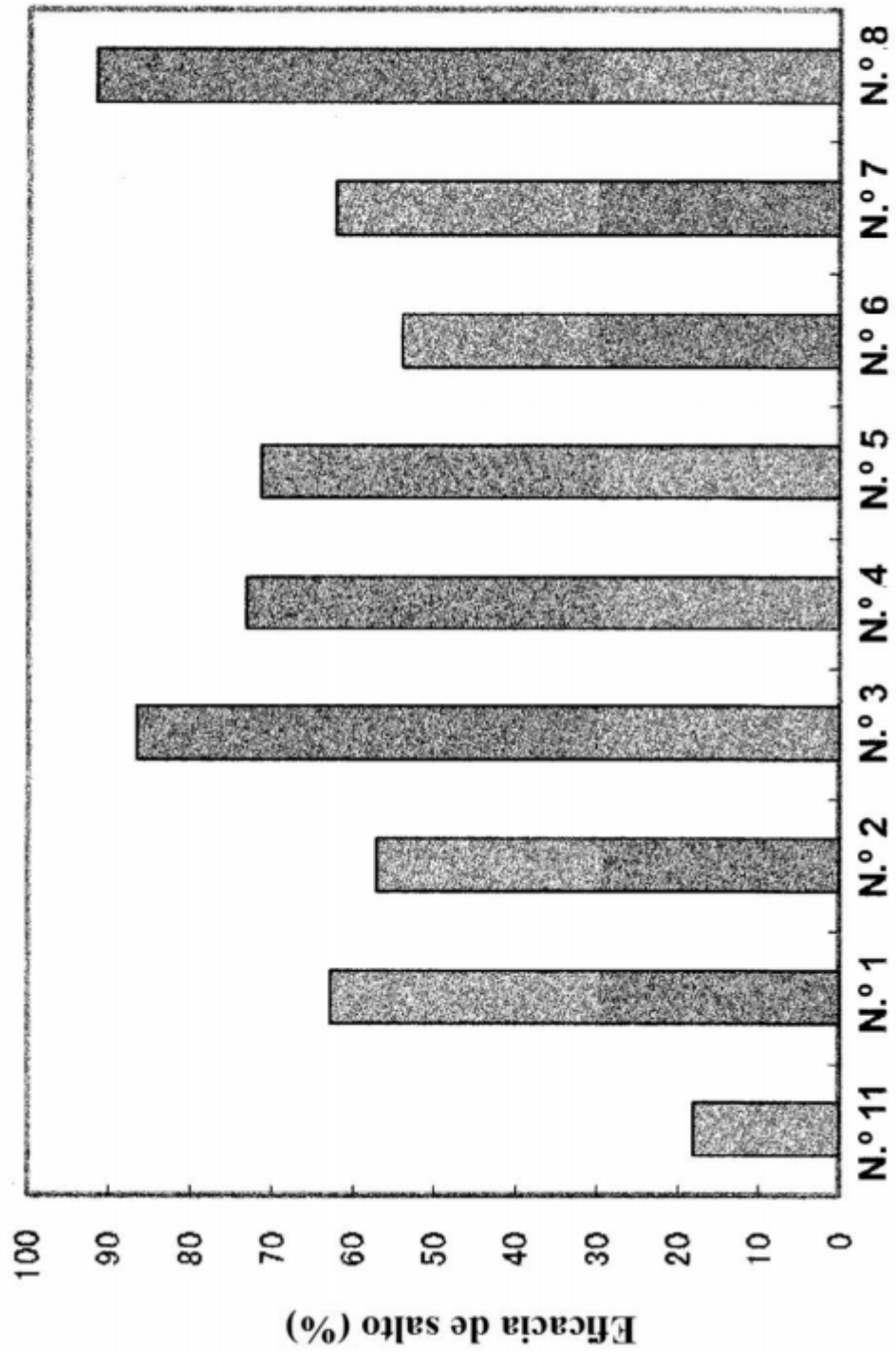


Figura 2

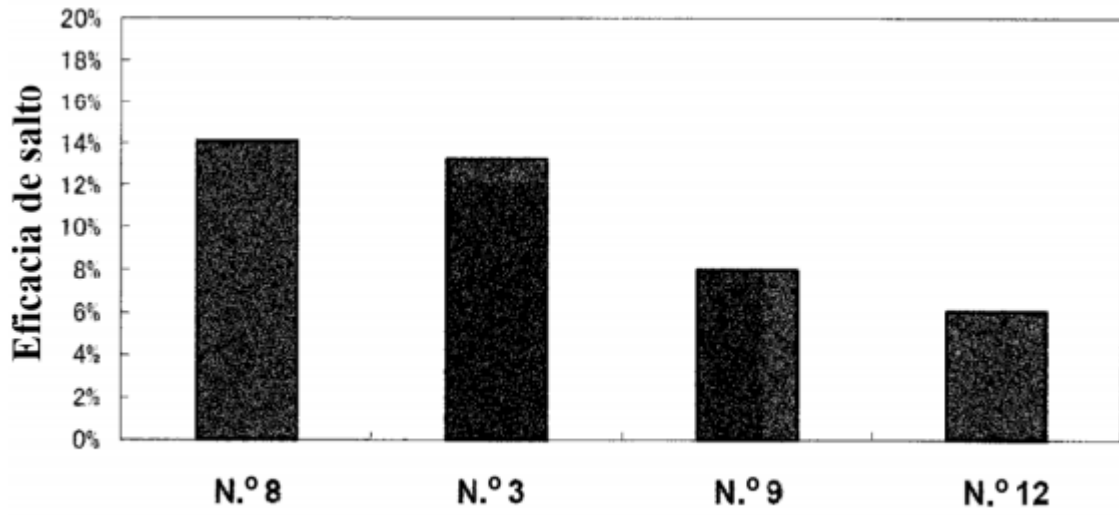


Figura 3

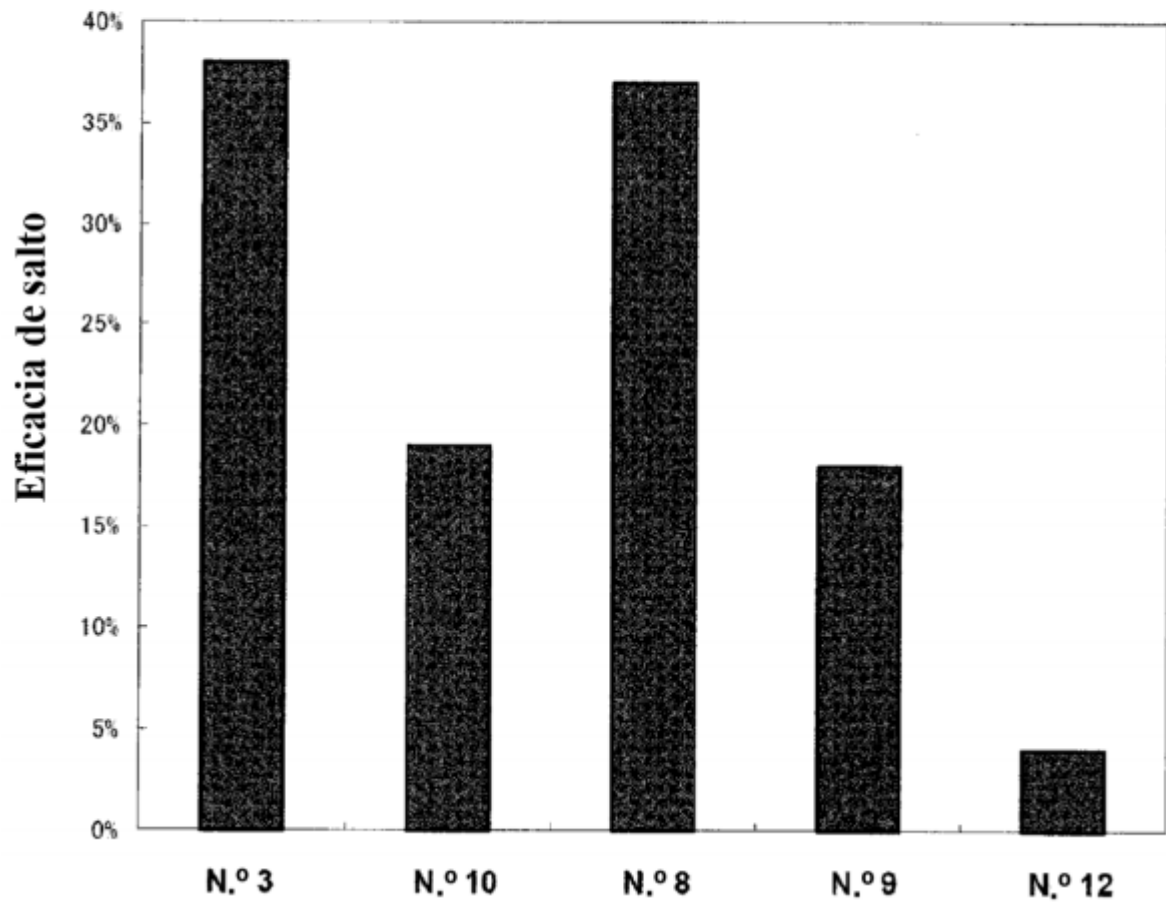


Figura 4

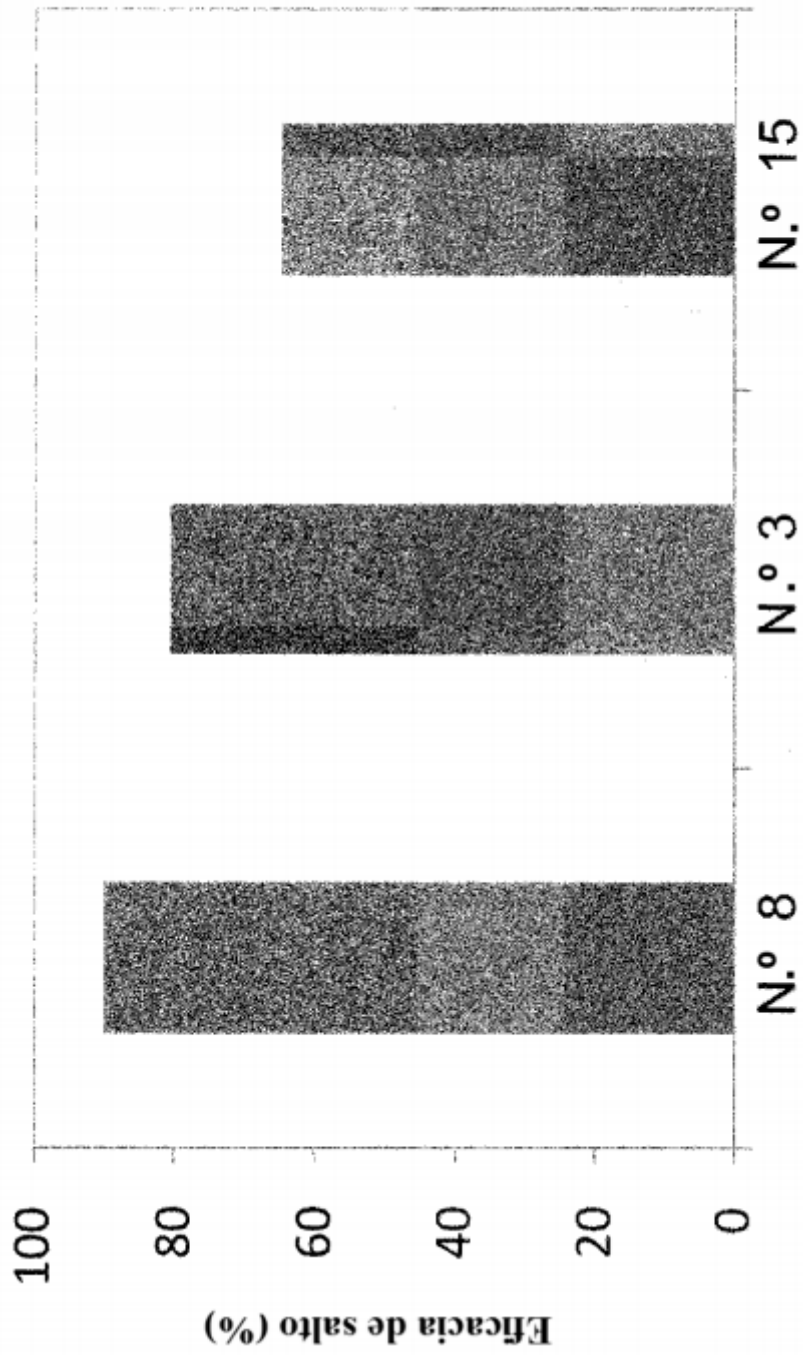


Figura 5

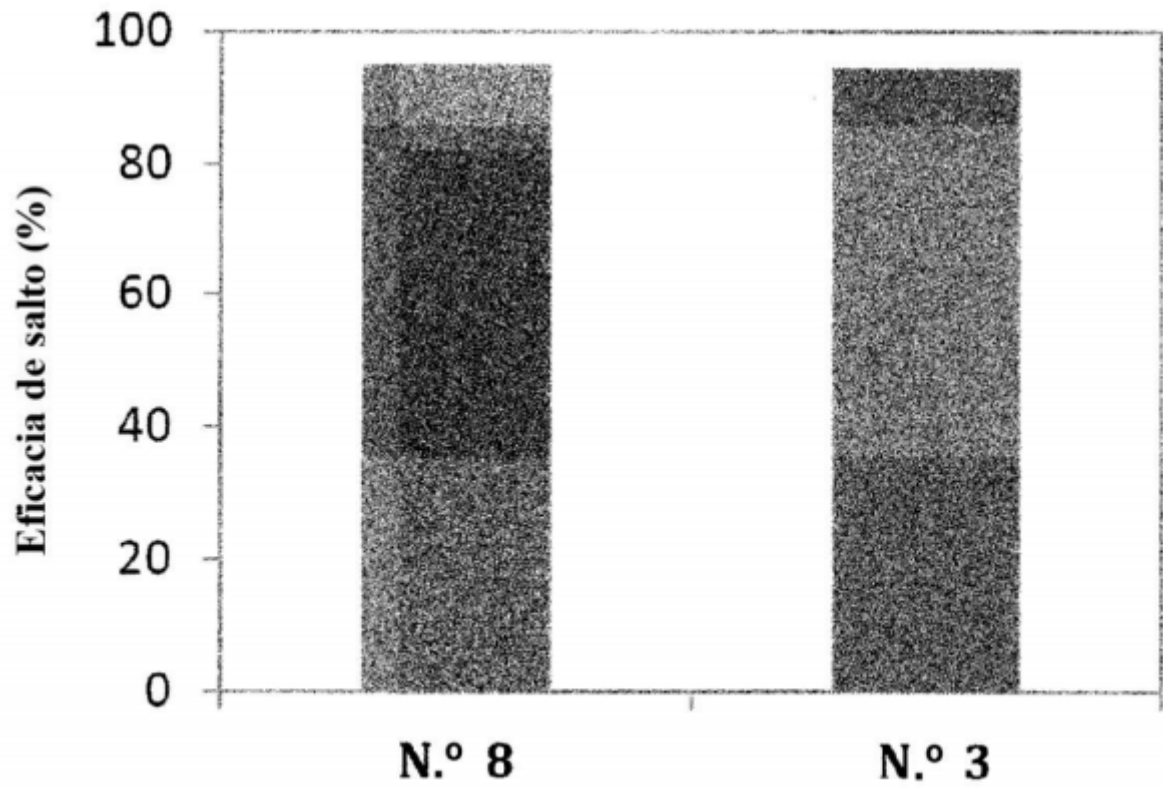


Figura 6

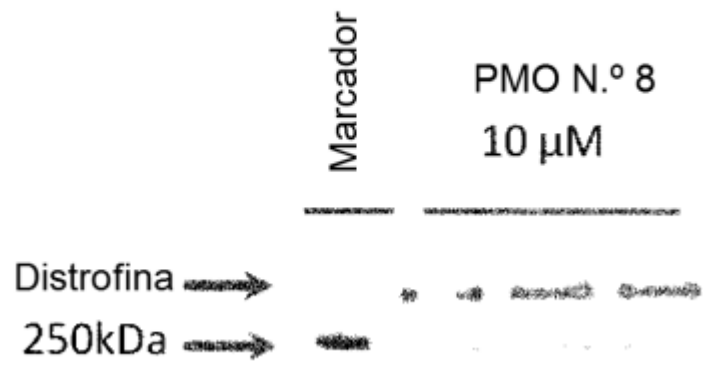
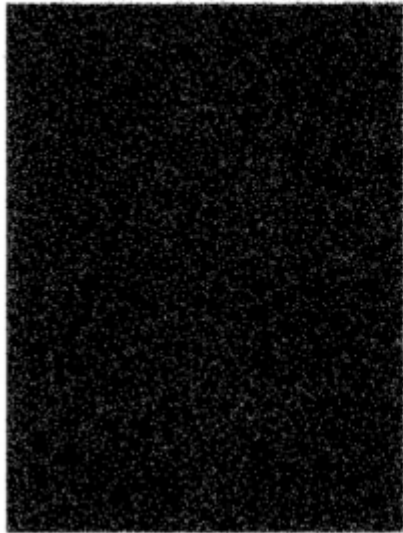


Figura 7

**Paciente con deleción del exón 48-52
(sin PMO)**



**Paciente con deleción del exón 48-52
(PMO N.º 8)**

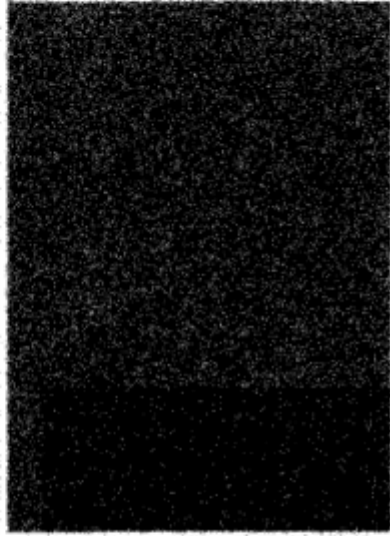
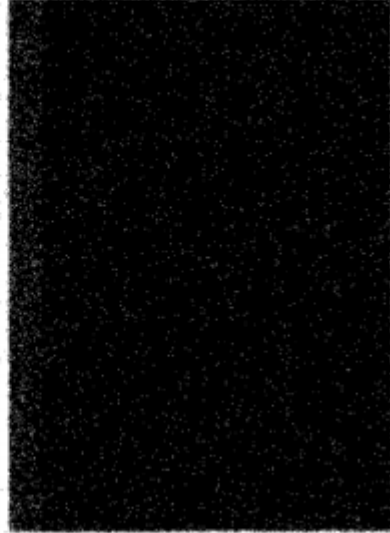


Figura 8

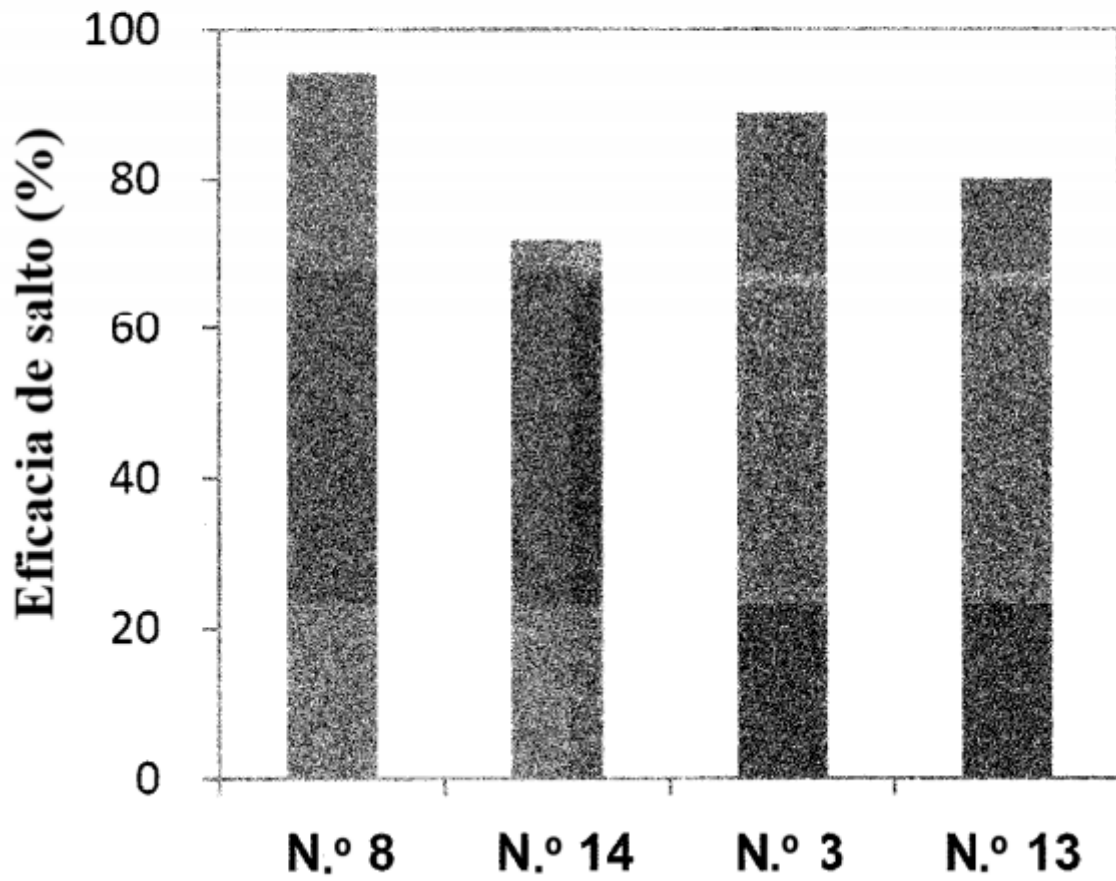


Figura 9

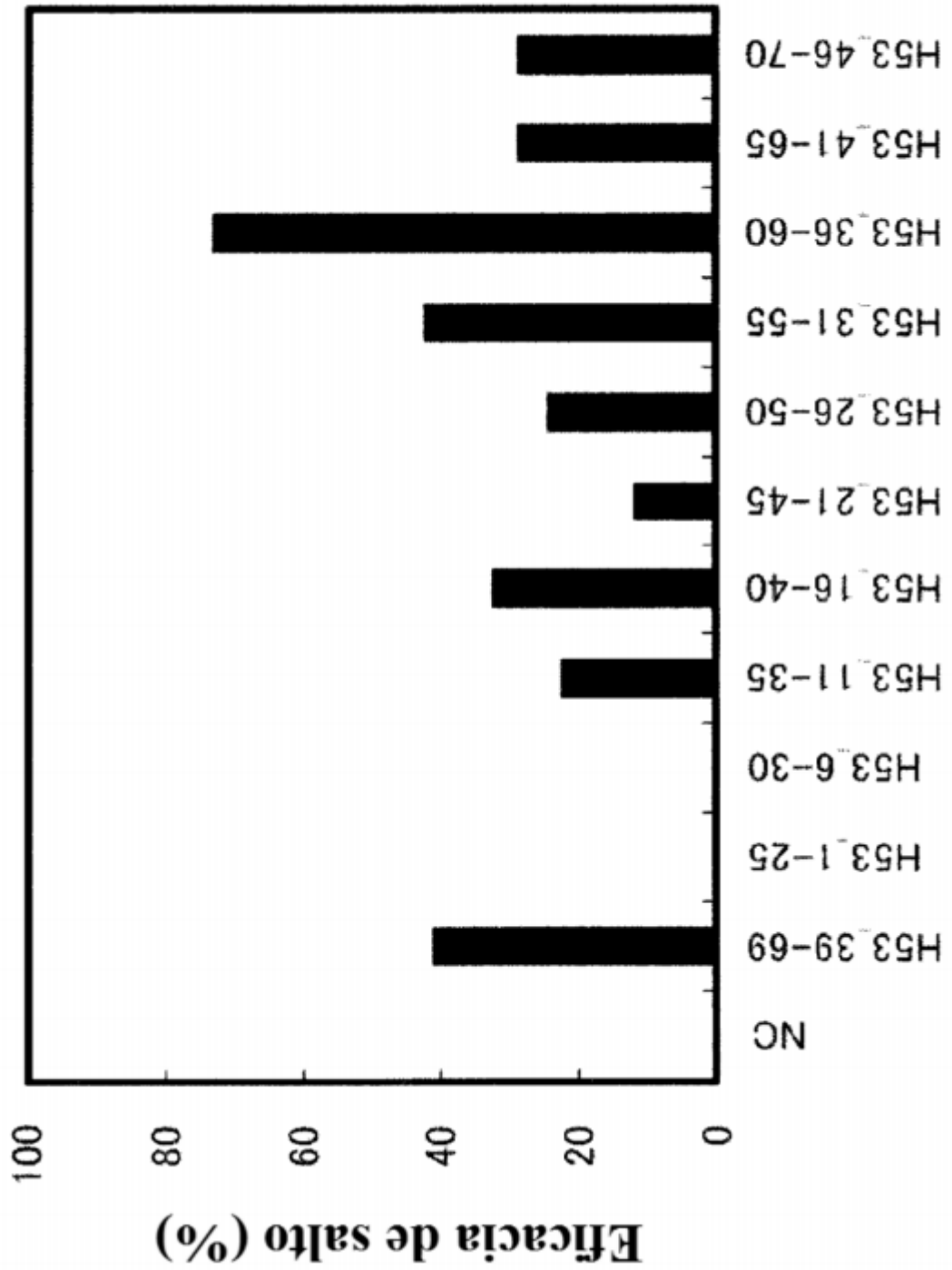


Figura 10

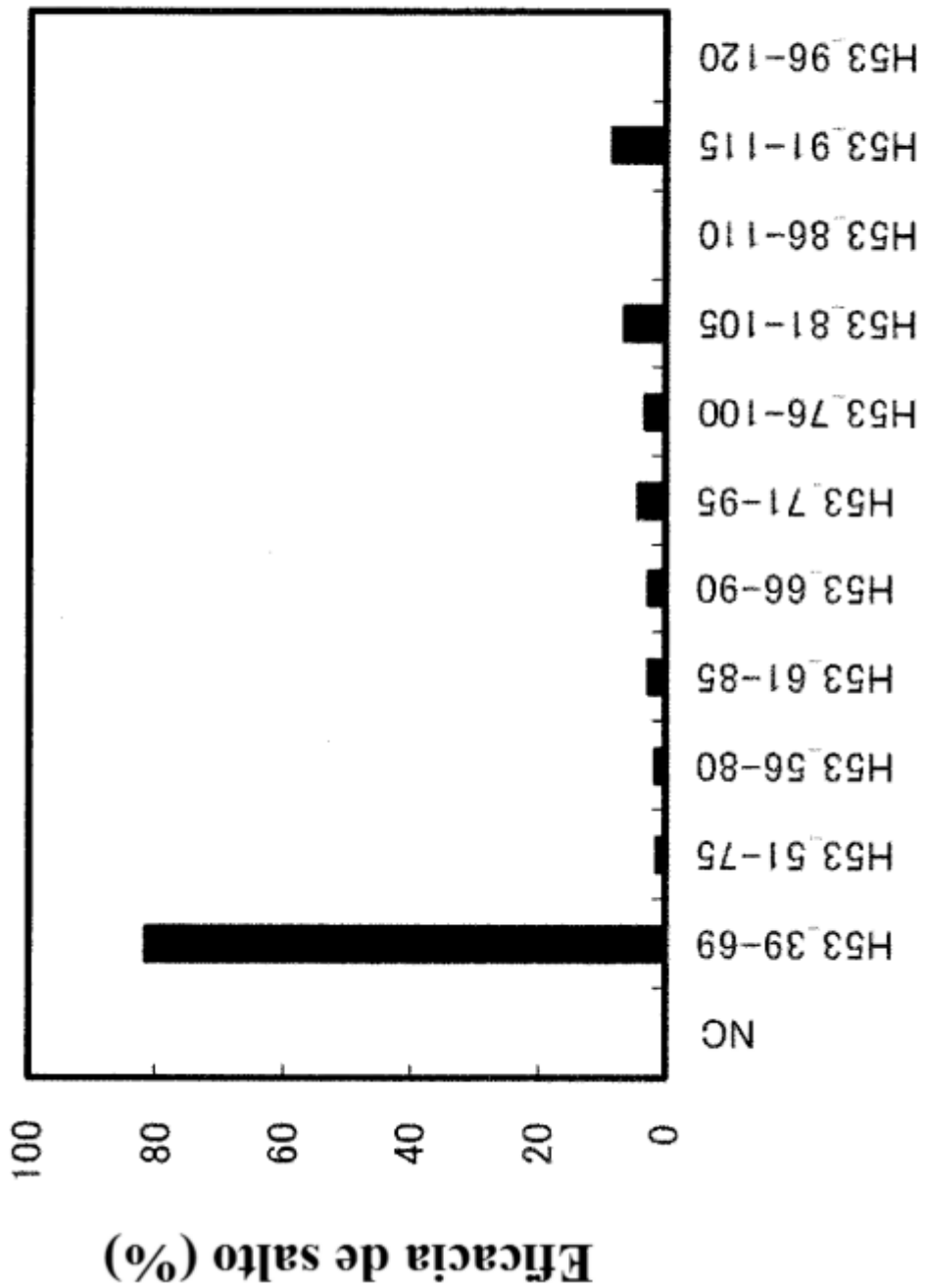


Figura 11

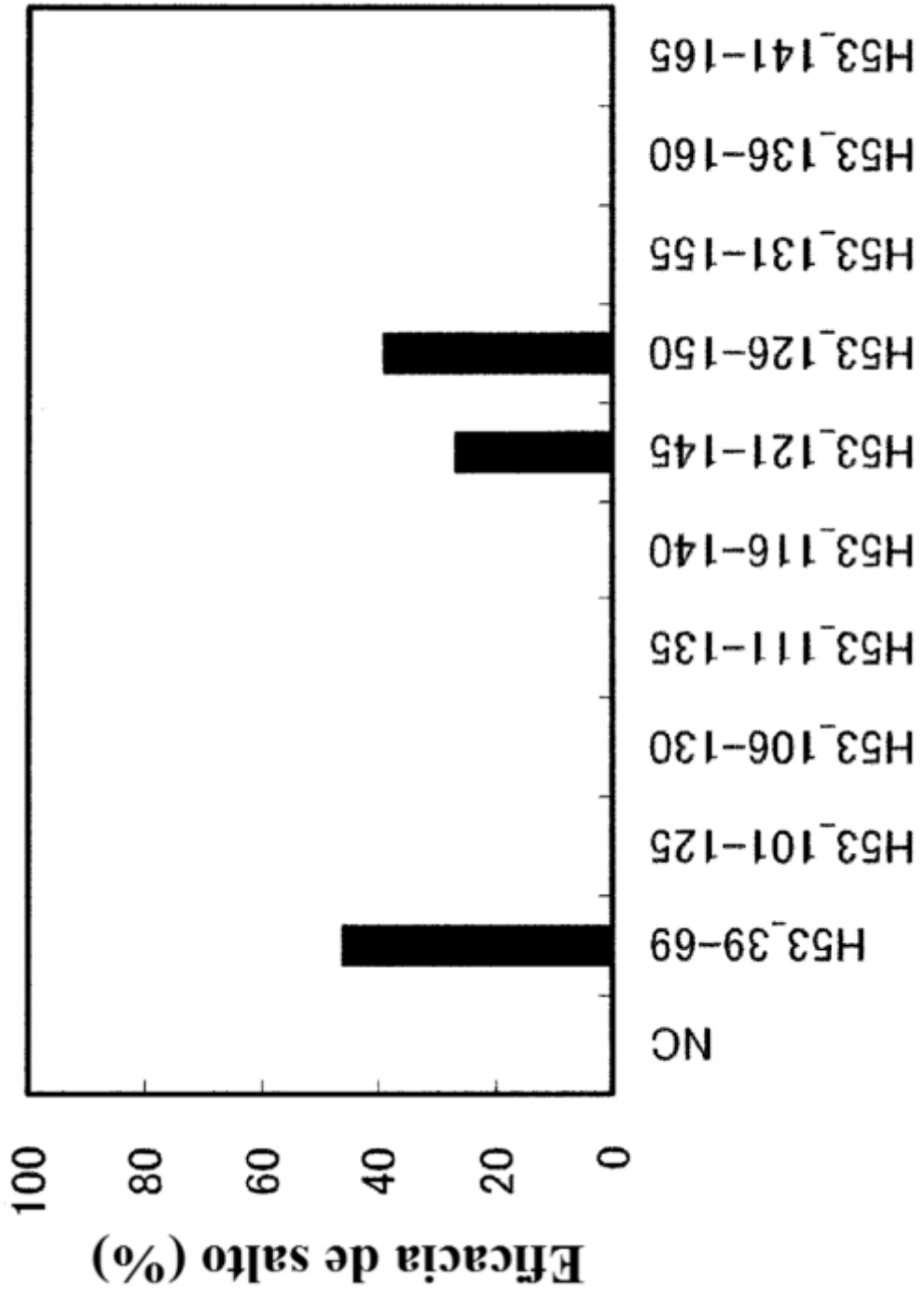


Figura 12

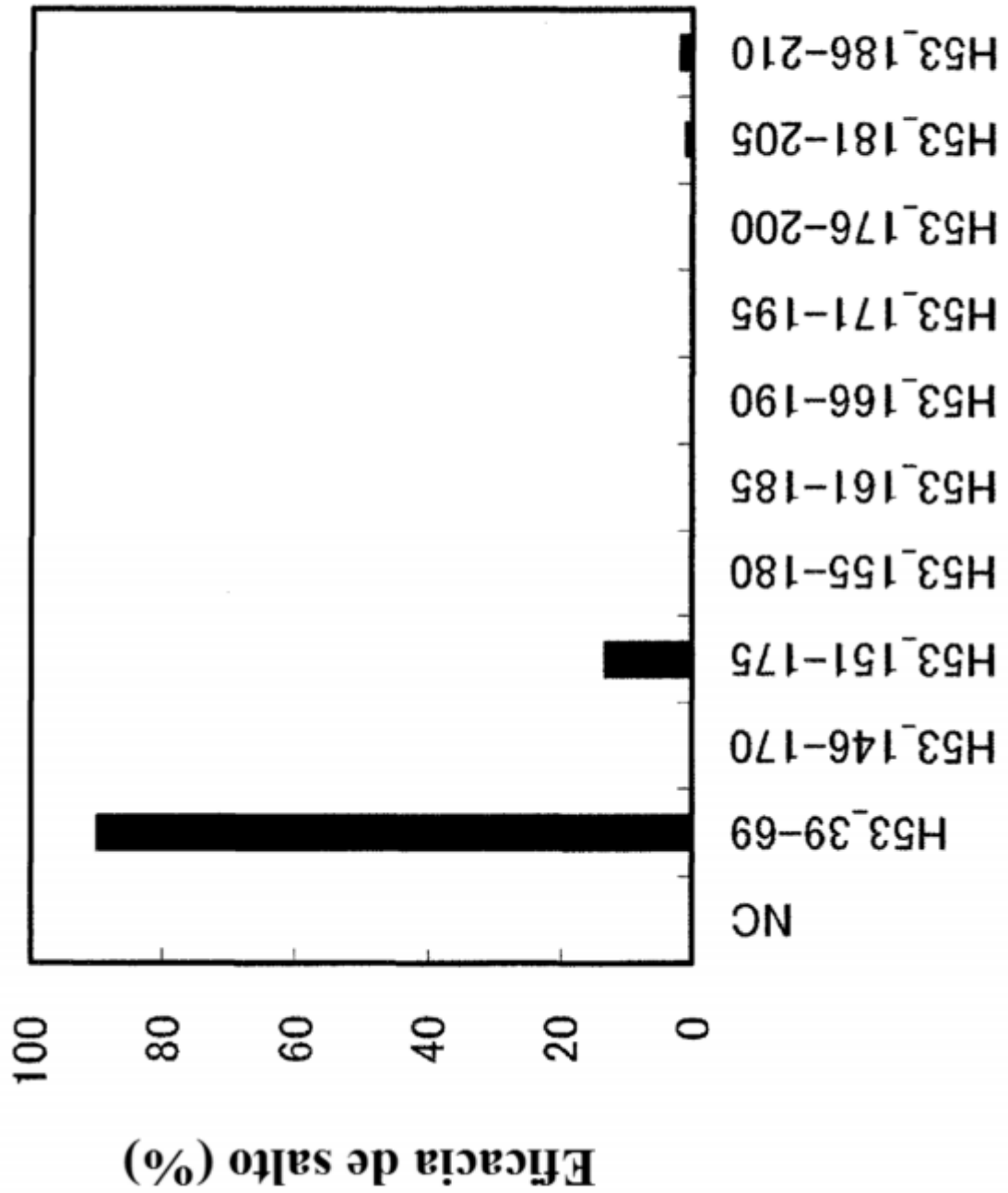


Figura 13

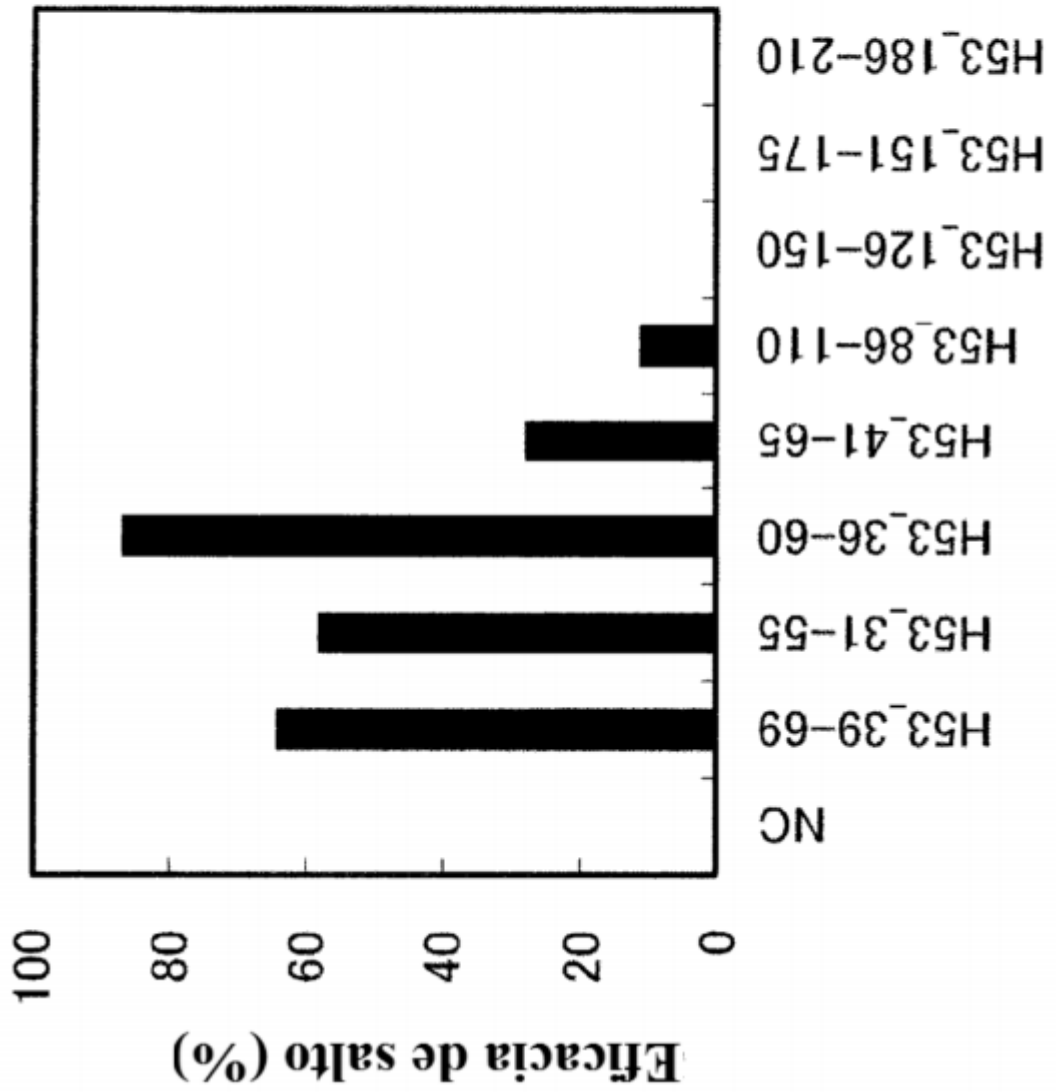


Figura 14

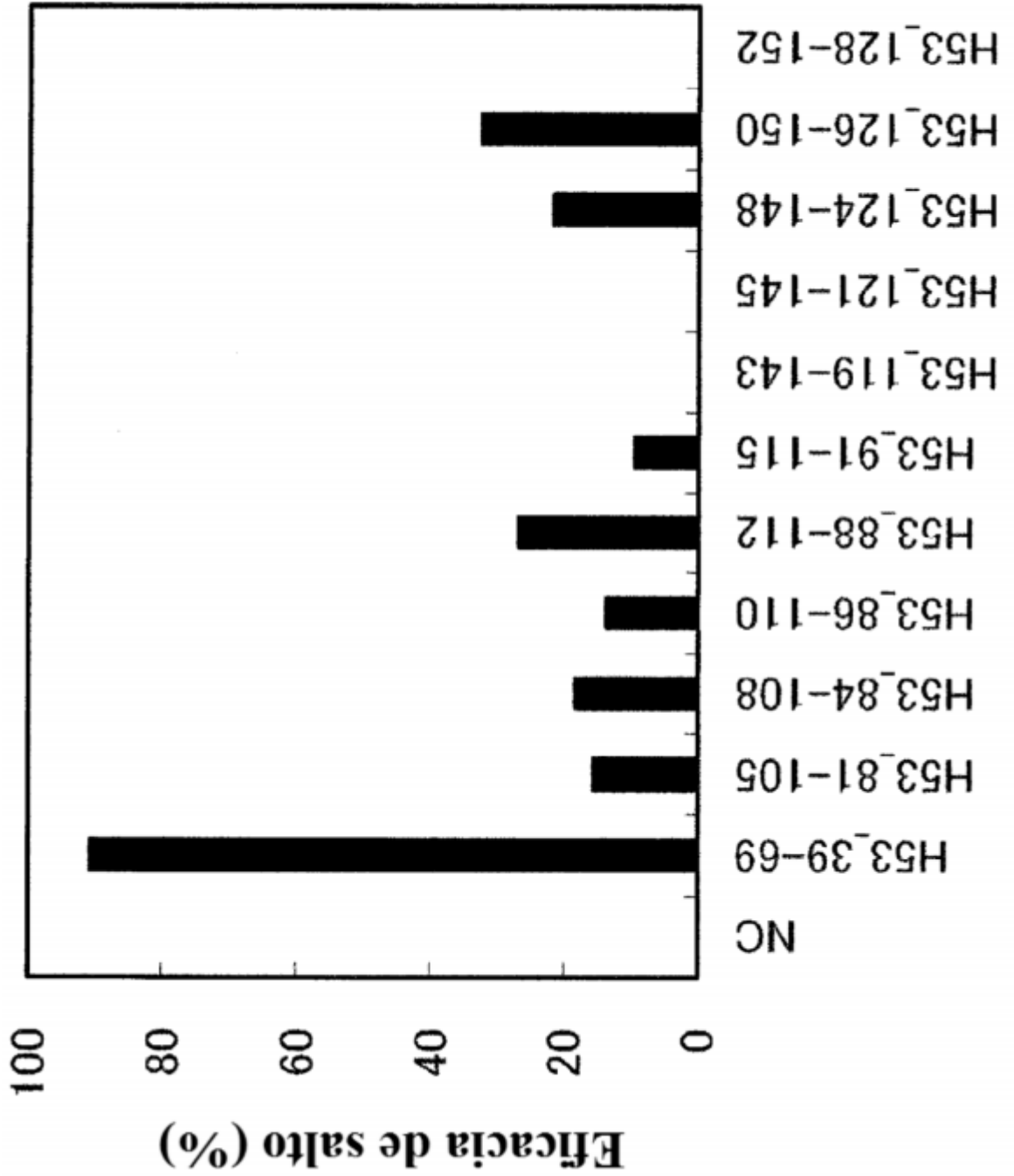


Figura 15

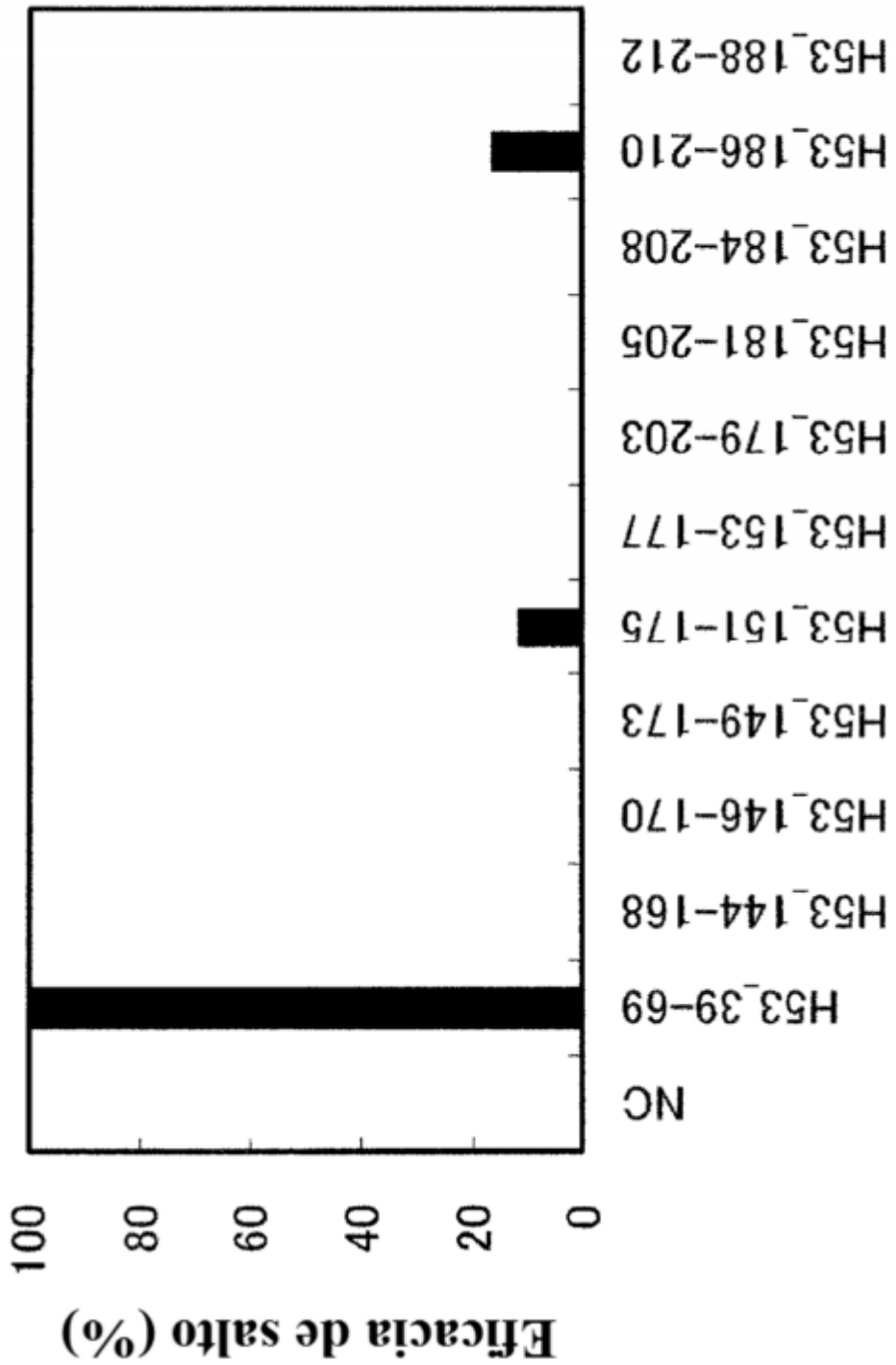


Figura 16

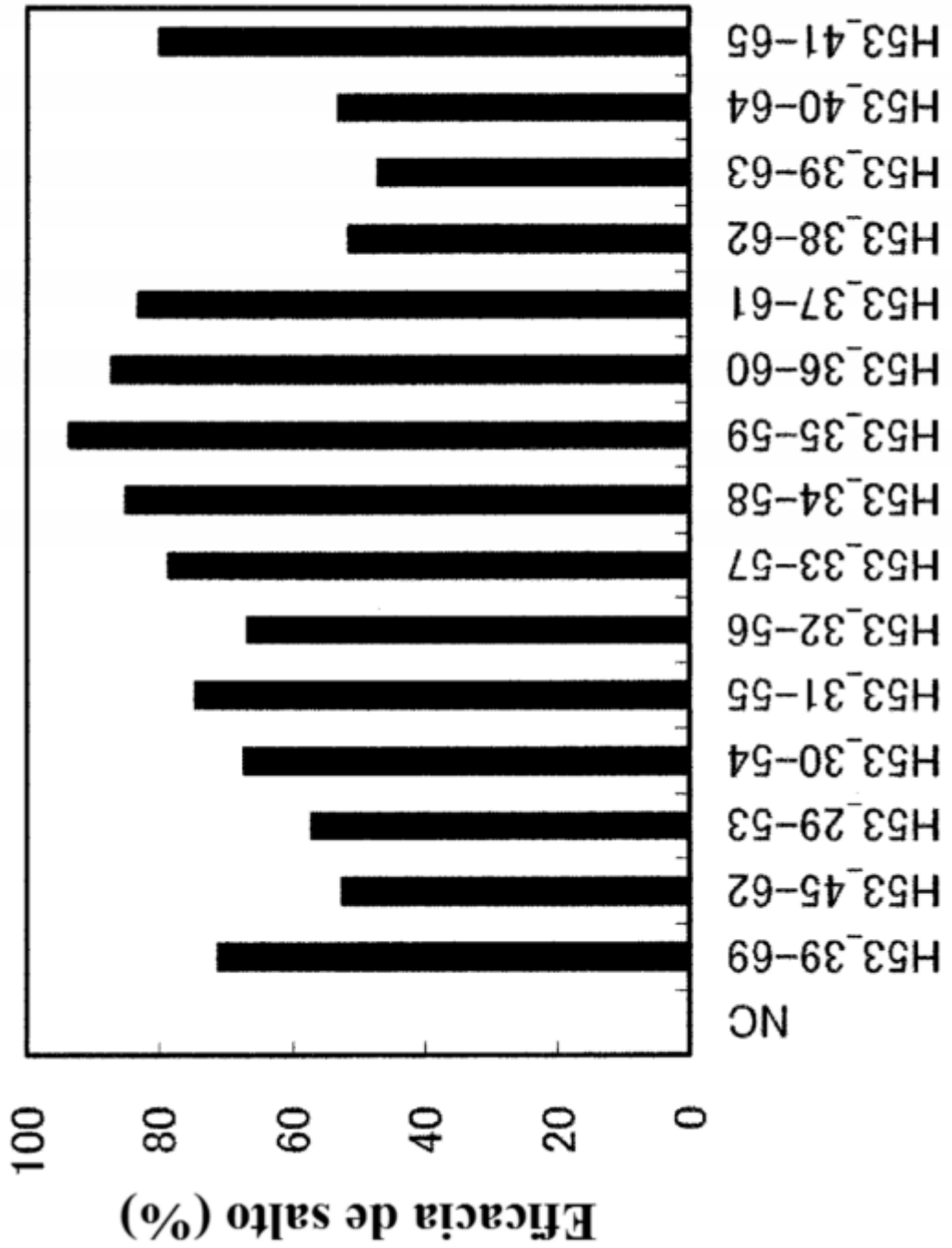


Figura 17

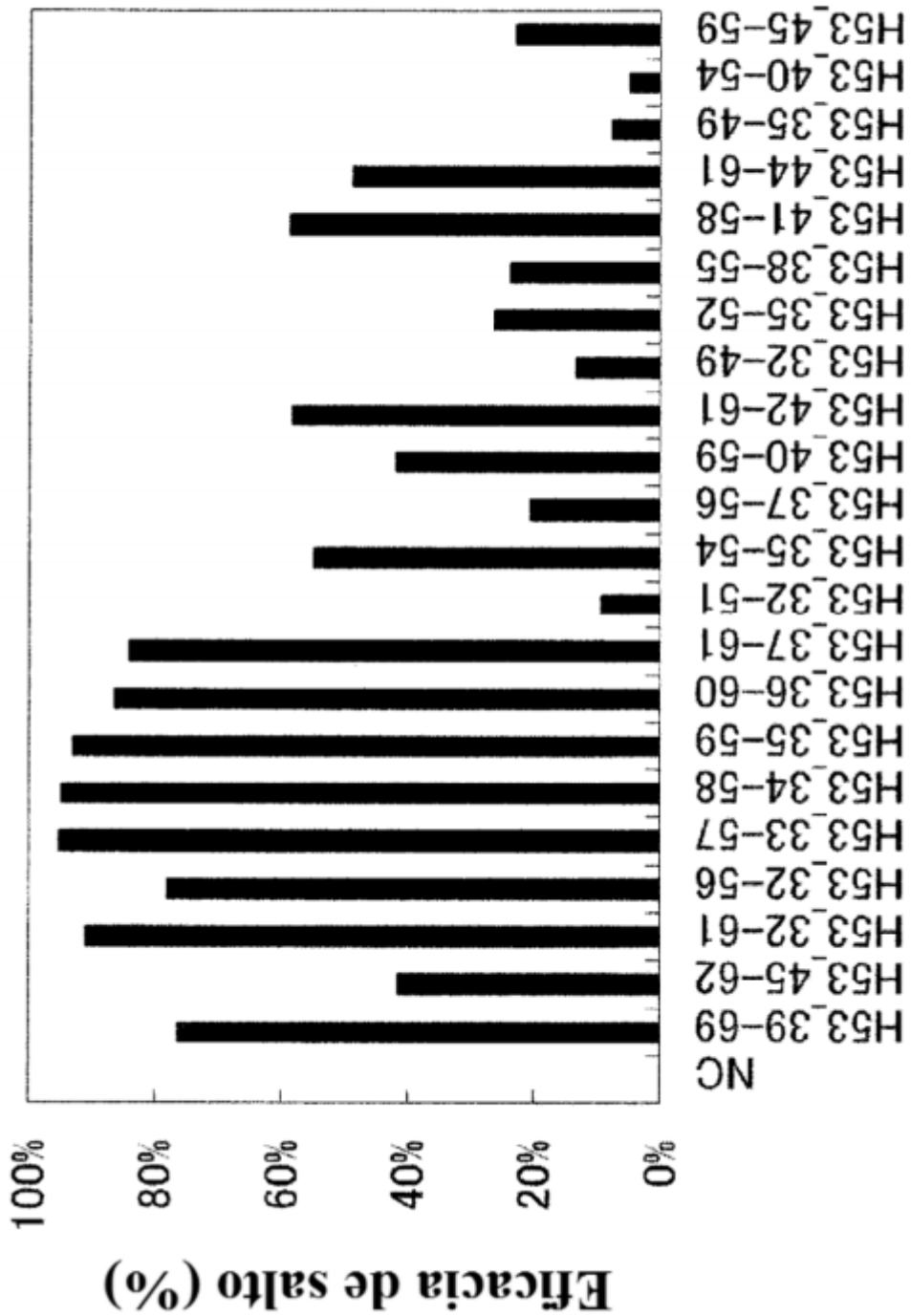


Figura 18

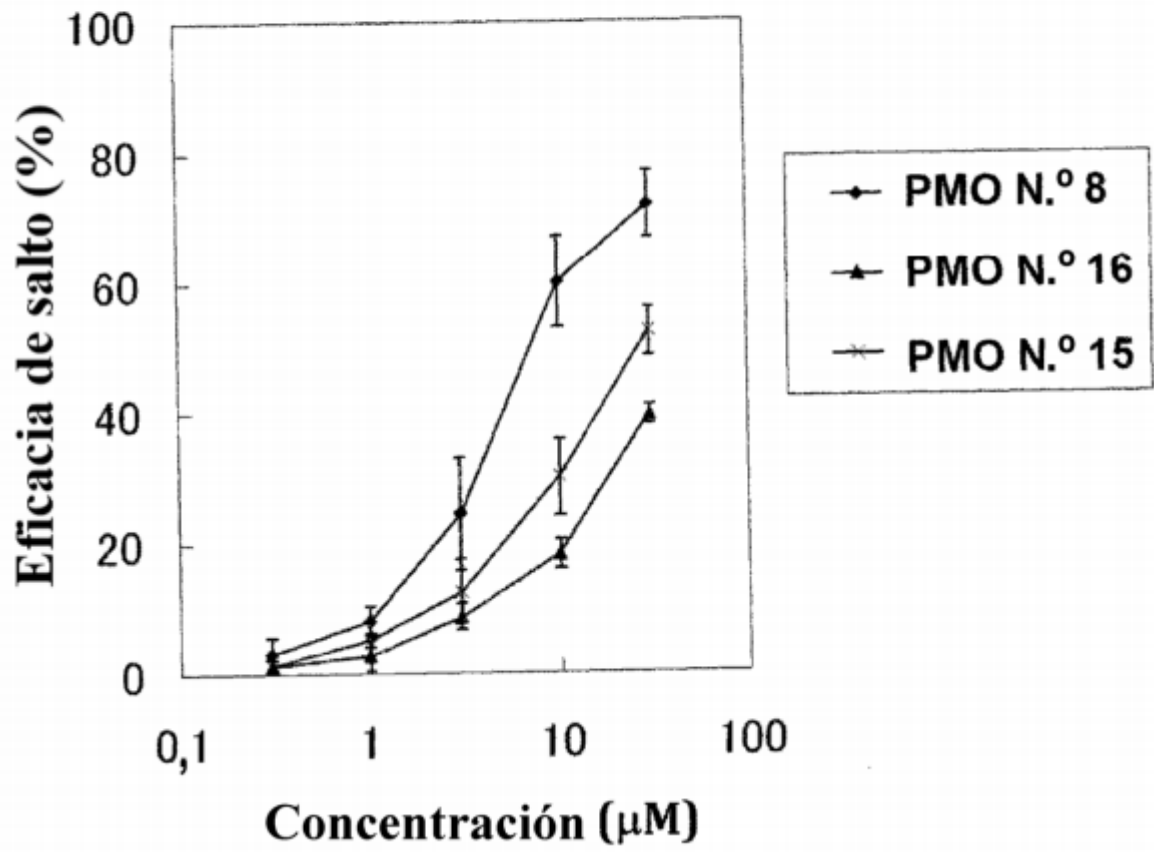


Figura 19

