

ÁCIDOS NUCLEICOS ANTISENTIDO

Campo técnico

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

Antecedentes de la técnica

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más frecuente
de distrofia muscular progresiva hereditaria que afecta a aproximadamente
10 3,500 varones recién nacidos. Aunque las funciones motoras rara vez son
diferentes de los humanos saludables en la infancia y niñez, la debilidad
muscular se observa en niños de unos 4 a 5 años de edad. Posteriormente,
la debilidad muscular progresa a la pérdida de la ambulación a
aproximadamente 12 años de edad y la muerte por insuficiencia cardíaca o
15 respiratoria a los 20 años. DMD es un trastorno muy severo. En la
actualidad, no existe una terapia eficaz para DMD disponibles y se ha
deseado fuertemente el desarrollo de un nuevo agente terapéutico.

Se conoce que el DMD es causado por una mutación en el gen de la
distrofina. El gen de la distrofina se encuentra en el cromosoma X y es un
20 gen enorme que consta de 2.2 millones de pares de nucleótidos de ADN.
El ADN se transcribe en precursores de ARNm, y los intrones se eliminan
por corte y empalme para sintetizar ARNm de 11,058 bases, en los cuales
se unen 79 exones. Este ARNm se traduce en 3,685 aminoácidos para
producir la proteína distrofina. La proteína distrofina está asociada con el
25 mantenimiento de la estabilidad de la membrana en las células musculares

y necesarias para hacer las células musculares menos frágiles. El gen de la distrofina de pacientes con DMD contiene una mutación y, por tanto, la proteína distrofina, que es funcional en las células musculares, rara vez se expresa. Por lo tanto, la estructura de las células del músculo no se puede
5 mantener en el cuerpo de los pacientes con DMD, que conduce a una gran
afluencia de iones de calcio en las células musculares. Por consiguiente,
una respuesta similar a la inflamación se produce para promover la fibrosis
para que las células musculares se puedan regenerar pero con dificultad.

La distrofia muscular de Becker (BMD) también es causada por una
10 mutación en el gen de la distrofina. Los síntomas incluyen debilidad
muscular acompañada de atrofia del músculo, pero son típicamente suaves
y lentos en el progreso de la debilidad muscular, en comparación con
DMD. En muchos casos, su aparición es en la edad adulta. Las diferencias
en los síntomas clínicos entre DMD y BMD se consideran que residen en si
15 el marco de lectura para los aminoácidos en la traducción de ARNm en la
proteína distrofina es interrumpida por la mutación o no (Documento No
Patente 1). Más específicamente, en la DMD, la presencia de la mutación
cambia el marco de lectura de aminoácidos de modo que se suprimió la
expresión de la proteína distrofina funcional, mientras que en la BMD la
20 proteína distrofina que funciona, aunque de manera imperfecta, se produce
debido a que el marco de lectura de aminoácidos se conserva, mientras
que una parte de los exones se eliminan por la mutación.

Se espera la omisión del exón para servir como un método para el
tratamiento de la DMD. Este método implica la modificación de empalme
25 para restaurar el marco de lectura de aminoácidos de ARNm de la

distrofina e induce la expresión de la proteína distrofina que tiene la función parcialmente restaurada (Documento No Patente 2). La parte de la secuencia de aminoácidos, que es un objetivo de la omisión de exón, se perderá. Por esta razón, la proteína distrofina expresada por este
5 tratamiento se vuelve más corto al normal pero debido a que se mantiene el marco de lectura de aminoácidos, la función de estabilizar las células musculares se retiene parcialmente. Por consiguiente, se espera que la omisión de exón llevará a que la DMD tenga los síntomas similares a la de BMD, que es más suave. El enfoque de la omisión del exón ha pasado las
10 pruebas en animales utilizando ratones o perros y ahora están siendo actualmente evaluados en ensayos clínicos en pacientes con DMD humanos.

La omisión de un exón se puede inducir mediante la unión de los ácidos nucleicos antisentido dirigidos, ya sea en el sitio de empalme 5' o 3' o de ambos sitios, o en los sitios internos de exón. Un exón sólo se incluye
15 en el ARNm cuando los dos sitios de empalme de los mismos se reconocen por el complejo de espliceosoma. Por lo tanto, la omisión del exón se puede inducir por la orientación de los sitios de empalme con ácidos nucleicos antisentido. Además, la unión de una proteína SR a un
20 potenciador de empalme exónico (ESE) se considera necesario para un exón a ser reconocido por el mecanismo de empalme. En consecuencia, la omisión del exón también se puede inducir dirigiendo el ESE.

Debido a que una mutación del gen de la distrofina puede variar dependiendo de los pacientes con DMD, los ácidos nucleicos antisentido
25 se deben diseñar con base en el sitio o el tipo de mutación genética

respectiva. En el pasado, los ácidos nucleicos antisentido que inducen la omisión del exón para todos los 79 exones se produjeron por Steve Wilton, et al., Universidad de Australia Occidental (Documento no patente 3) y los ácidos nucleicos antisentido que inducen la omisión del exón para 39 exones se produjeron por Annemieke Aartsma-Rus, et al., Países Bajos (Documento no patente 4).

Se considera que aproximadamente el 13% de todos los pacientes con DMD pueden ser tratados por omisión del exón 51 (en lo sucesivo denominado "exón 51"). En los últimos años, una pluralidad de organizaciones de investigación informó sobre los estudios en los cuales el exón 51 del gen de la distrofina fue blanco para la omisión del exón (documentos de patente 1 a 6; documentos de no patente 5 a 6). Sin embargo, todavía no se ha establecido una técnica para omitir el exón 51 con una alta eficiencia.

15 **Documentos de la técnica previa**

Documentos de patente

Documento de Patente 1: Publicación Internacional WO 2004/048570

Documento de Patente 2: Publicación Internacional WO 2002/024906

Documento de Patente 3: Publicación Internacional WO 2010/048586

20 Documento de Patente 4: Publicación Internacional WO 2010/050801

Documento de Patente 5: US 2010/0168212

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

Documento de no patente 2: Matsuo M., Brain Dev 1996; 18: p. 167-
25 172

Documento de no patente 3: Wilton S. D., et al., Molecular Therapy 2007: 15: p. 1288-1296

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

5 Documento de no patente 5: Aoki Y., et al, Molecular therapy 2010: 18: p.1995-2005

Documento de no patente 6: Nakano S., et al, Pediatr Int. 2011: 53: 524-429

Descripción de la invención

10 Problemas a resolver por la invención

Bajo las circunstancias anteriores, se han deseado los oligómeros antisentido que inducen la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina con una alta eficiencia y la terapéutica con distrofia muscular que comprenden oligómeros de los mismos.

15 **Medios para resolver el problema**

Como resultado de estudios detallados de los contenidos técnicos de los documentos anteriores y la estructura del gen de la distrofina, los presentes inventores han encontrado que la omisión del exón 51 se puede inducir con una alta eficiencia mediante la administración del oligómero antisentido que tiene las secuencias de nucleótidos representadas por la SEC ID NO: 1 y 2. Con base en este hallazgo, los presentes inventores han completado la presente invención.

Es decir, la presente invención es como sigue.

[1] Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que
25 consiste de (a) a (d) como sigue:

(a) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2;

(b) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de nucleótidos que tiene una eliminación, sustitución, inserción y/o adición de
5 1 a 5 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(c) un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de nucleótidos de
10 la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(d) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas con un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y
15 tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

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

(e) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de
20 nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2;

(f) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una eliminación, sustitución, inserción y/o adición de
1 a 3 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la
25 distrofina humana;

(g) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

5 (h) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad a un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

10 [3] Un oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste de (i) y (j) como sigue:

 (i) un oligómero antisentido que consiste de una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2; y

 (j) un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos
15 que tiene al menos 90% de identidad con una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

 [4] El oligómero antisentido de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3] anterior, que es un oligonucleótido.

20 [5] El oligómero antisentido de acuerdo con [4] anterior, en donde se modifica el resto de azúcar y/o la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido.

 [6] El oligómero antisentido de acuerdo con [4] o [5] anterior, en donde el resto de azúcar de al menos un nucleótido que constituye el
25 oligonucleótido es una ribosa en la cual el grupo 2'-OH se sustituye por

cualquiera seleccionado del grupo que consiste de OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br e I (en donde R es un alquilo o un arilo y R 'es un grupo alquileo).

5 [7] El oligómero antisentido de acuerdo con cualquiera de [4] a [6] anteriores, en donde la región de unión a fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace fosfonato de alquilo, un enlace fosforamidato y un enlace boranofosfato.

10 [8] El oligómero antisentido de acuerdo con cualquiera de [1] a [3] anteriores, que es un oligómero de morfolino.

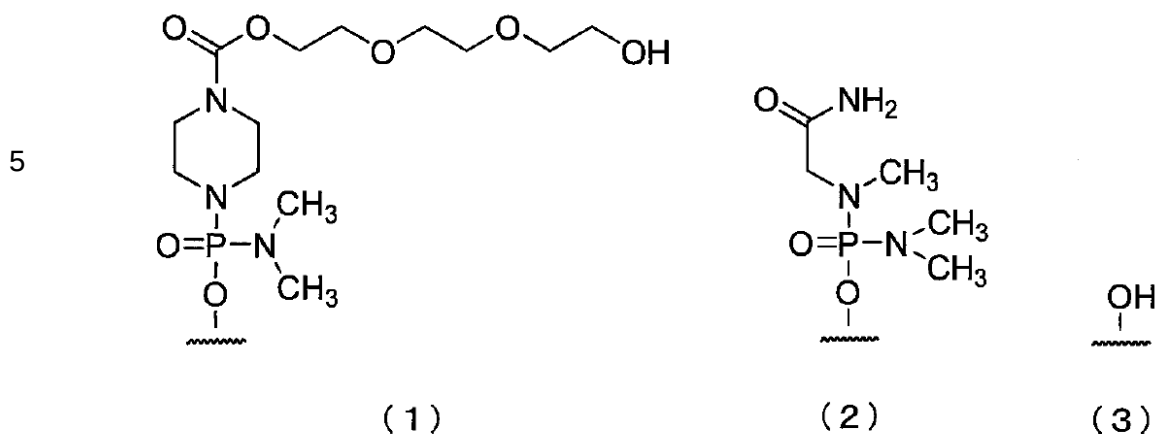
[9] El oligómero antisentido de acuerdo con [8] anterior, en donde se modifica el resto del anillo de morfolina, la región de unión a fosfato y/o el extremo 3' y/o el extremo 5' de al menos un morfolino que constituye el
15 oligómero de morfolina.

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

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

[12] El oligómero antisentido de acuerdo con cualquiera de [9] a [11]
25 anteriores, en donde el extremo 5' es cualquiera de las fórmulas químicas

(1) a (3) como sigue:



10

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

15 [14] La composición farmacéutica de acuerdo con [13] anterior, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

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

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

25 [17] El método para el tratamiento de acuerdo con [15] o [16]

anteriores, en donde el paciente es un ser humano.

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

5 [19] El oligómero antisentido de acuerdo con cualquiera de [1] a [12] anteriores, para uso en el tratamiento de la distrofia muscular.

 [20] El oligómero antisentido de acuerdo con [19] anterior, en donde el paciente con distrofia muscular en dicho tratamiento es un paciente con eliminaciones de nucleótidos dentro de los exones 29-50, 50, 45-50, 48-50,
10 49-50, 52, 52-63, 13-50, 19-50, 43-50 o 47-50.

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

Efectos de la invención

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

Breve descripción de las figuras

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

Modo para llevar a cabo la invención

 En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle. Las
25 modalidades descritas a continuación están destinadas a ser presentadas

a modo de ejemplo meramente para describir la invención, pero no se limitan sólo a las siguientes modalidades. La presente invención se puede implementar de diversas maneras sin apartarse de la esencia de la invención.

5 1. Oligómeros antisentido

La presente invención proporciona el oligómero antisentido (denominado en lo sucesivo como "oligómero antisentido de la presente invención") que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana con una alta eficiencia.

10 **Exón 51 en el gen de la distrofina humana**

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

En el genoma humano, el gen de la distrofina humana se ubica en el
15 locus Xp21.2. El gen de la distrofina humana tiene un tamaño de 2.2 millones de pares de nucleótidos y es el gen más grande entre los genes humanos conocidos. Sin embargo, las regiones de codificación del gen de la distrofina humana son sólo 14kb, distribuidos como 79 exones en todo el gen de la distrofina humana (Roberts, RG, et al, Genomics, 16: 536-538
20 (1993)). El pre-ARNm, que es la transcripción del gen de la distrofina humana, se somete a empalme para generar el ARNm maduro de 14 kb. La secuencia de nucleótidos del gen de la distrofina humana de tipo silvestre es previamente conocido (No. de acceso de GeneBank NM_004006).

La secuencia de nucleótidos del exón 51 en el gen de la distrofina de
25 tipo salvaje humana está representada por la SEC ID NO: 3.

Oligómero antisentido

El oligómero antisentido de la presente invención está diseñado para que cause la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana, modificando de este modo la proteína codificada por tipo DMD del gen de la distrofina en el tipo BMD de la proteína distrofina. Por consiguiente, el
5 la distrofina en el tipo BMD de la proteína distrofina. Por consiguiente, el exón 51 en el gen de la distrofina que es el objetivo de la omisión del exón por el oligómero antisentido incluye ambos tipos salvajes y mutantes.

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

(a) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2;

(b) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de nucleótidos que tiene una supresión, sustitución, inserción y/o adición de 1
15 a 5 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(c) un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y tiene una actividad que causa la omisión del exón
20 51 en el gen de la distrofina humana; y

(d) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas con un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2 y
25 tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la

distrofina humana.

Los oligómeros antisentido de (b) a (d) son mutantes del oligómero antisentido de (a) en particular y están destinadas a corresponder con las mutaciones del gen de la distrofina de los pacientes, por ejemplo, polimorfismo.

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

(k) Un oligómero antisentido que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las SEC ID NO: 6-33;

(l) Un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene una supresión, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las SEC ID NO: 6 a 33 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(m) Un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID NO: 6-33 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(n) Un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas con un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las SEC ID NO: 6-33 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

Los oligómeros antisentido de (l) a (n) son mutantes del oligómero

antisentido de (k), en particular y se pretende que correspondan a las mutaciones, del gen de distrofina de los pacientes, por ejemplo, polimorfismo.

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

(o) Un oligómero antisentido que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las SEC ID NO: 6-33;

(p) Un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de
10 nucleótidos que tiene una supresión, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 3 nucleótidos en la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las SEC ID NOS: 6 a 33 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana;

(q) Un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos
15 que tiene al menos 80% de identidad con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID NO: 6-33 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana; y

(r) Un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones de alta rigurosidad a un oligonucleótido que consiste en una complementariedad
20 de secuencia de nucleótidos a la secuencia de nucleótidos mostrada por cualquiera de las SEC ID NO: 6-33 y tiene una actividad que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

Además, el oligómero antisentido de la presente invención es el oligómero antisentido que se selecciona de un grupo que consiste de (i) y
25 (j) como sigue:

(i) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID NO: 6-33; o

(j) un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las SEC ID NO: 6-33 y tiene una actividad
5 que causa la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas" se refiere a, por ejemplo, un oligómero antisentido obtenido mediante hibridación de colonias, hibridación en placa, hibridación de Southern o similares,
10 utilizando como sonda la totalidad o parte de un oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria a la secuencia de nucleótidos, por ejemplo, de la SEC ID NO: 1. El método de hibridación que se puede usar incluye los métodos descritos en, por ejemplo,
15 "Sambrook y 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.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "condiciones rigurosas" puede ser cualquiera de las condiciones rigurosas bajas, las
20 condiciones restrictivas moderadas o condiciones rigurosas altas. El término "condiciones rigurosas bajas" es, por ejemplo, 5x SSC, solución de Denhardt 5x, 0.5% SDS, 50% de formamida a 32°C. El término "condiciones rigurosas moderadas" es, por ejemplo, 5x SSC, solución de Denhardt 5x, 0.5% SDS, 50% de formamida a 42°C o 5x SSC, 1% SDS, 50
25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50% de formamida a 42°C. El término "condiciones

rigurosas altas" es, por ejemplo, (1) 5x SSC, solución de Denhardt 5x, 0.5% SDS, 50% de formamida a 50°C, (2) 0.2 x SSC, 0.1% de SDS a 60°C, (3) 0.2x SSC, 0.1% de SDS a 62°C, (4) 0.2 x SSC, 0.1% de SDS a 65°C o (5) 0.1 x SSC, 0.1% de SDS a 65°C, pero sin limitarse a los mismos . En
5 estas condiciones, se espera que el oligómero antisentido con mayor homología a obtener de manera eficiente a temperaturas más altas, aunque múltiples factores están implicados en la rigurosidad de hibridación incluyendo la temperatura, concentración de sonda, longitud de la sonda, fuerza iónica, tiempo, concentración de sal y otros, y los expertos en la
10 técnica pueden seleccionar aproximadamente estos factores para lograr la rigurosidad similar.

Cuando se usan kits comercialmente disponibles para la hibridación, por ejemplo, se puede utilizar un sistema de etiquetado y detección directa AlkPhos (GE Healthcare). En este caso, de acuerdo con el protocolo
15 adjunto, después del cultivo con una sonda etiquetada durante la noche, la membrana se lava con un tampón de lavado primario que contiene 0.1% (p/v) de SDS a 55°C, detectando de ese modo el oligómero antisentido hibridado. Alternativamente, cuando la sonda se etiqueta con digoxigenina (DIG) utilizando un reactivo comercialmente disponible (por ejemplo, una
20 mezcla de etiquetado de PCR (Roche Diagnostics), etc.) en la producción de una sonda basada en la totalidad o parte de la secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 3, la hibridación se puede detectar con un Kit de detección de ácido nucleico DIG (Roche Diagnostics).

25 Además, del oligómero antisentido descrito anteriormente, otro

oligómero antisentido que se puede hibridar incluyen oligómeros antisentido que tienen 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, 99.1% o más, 99.2% o más, 99.3% o más, 99.4% o más, 99.5% o más, 5 99.6% o más, 99.7% o más, 99.8% o más y 99.9% o más de identidad con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID NO: 1 o 2, de acuerdo con lo calculado por el software de búsqueda de homología tal como FASTA y BLAST utilizando los parámetros por defecto.

La identidad entre las secuencias de nucleótidos se puede determinar 10 usando el algoritmo FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) o el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873, 1993). Se han desarrollado programas llamados blastn, blastx, tblastn y tblastx basado en el algoritmo BLAST (Altschul SF, et al.. J. Mol 15 Biol. 215: 403, 1990). Cuando una secuencia de nucleótidos se secuencia utilizando blastn, los parámetros son, por ejemplo, puntuación = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de cada programa.

El término "causa omisión del exón 51 en el gen de la distrofina 20 humana" se entiende que significa que mediante la unión del oligómero antisentido de la presente invención al sitio correspondiente al exón 51 de la transcripción (por ejemplo, pre-ARNm) del gen humano de la distrofina, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos correspondiente al extremo 5' del exón 53 se empalma en la secuencia de nucleótidos correspondiente al 25 extremo 3' del exón 50 en los pacientes con DMD con una supresión del

exón 52 cuando la transcripción se somete a corte y empalme, lo que resulta en la formación del ARNm maduro que está libre de desplazamiento del marco de codón.

Aquí, el término "unión" descrito anteriormente está destinado a
5 significar que cuando el oligómero antisentido de la presente invención se mezcla con la transcripción del gen de la distrofina humana, ambos se hibridan en condiciones fisiológicas para formar un ácido nucleico de doble cadena. El término "en condiciones fisiológicas" se refiere a las condiciones establecidas para imitar el entorno *in vivo*, en términos de pH,
10 composición de sal y temperatura. Las condiciones son, por ejemplo, 25 a 40°C, preferiblemente 37°C, pH 5 a 8, preferiblemente pH 7.4 y 150 mM de la concentración de cloruro de sodio.

Si se causa o no la omisión del exón 51 en el gen de la distrofina humana se puede confirmar mediante la introducción del oligómero
15 antisentido de la presente invención en una célula de expresión de distrofina (por ejemplo, células de rabdomiosarcoma humana), amplificando la región que rodea el exón 51 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 el PCR anidado o el análisis de la
20 secuencia en el producto amplificado por PCR.

La eficiencia de omisión se puede determinar cómo sigue. El ARNm para el gen de la distrofina humana se obtiene de las células de ensayo; en el ARNm, se mide el nivel del polinucleótido "A" de la banda donde se omite el exón 51 y el nivel de polinucleótido "B" de la banda en el exón 51
25 no se omite. El uso de estos valores de medición de "A" y "B", se calcula

la eficiencia por la siguiente ecuación:

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

Preferiblemente, el oligómero antisentido de la presente invención causa la omisión del exón 51 con la eficiencia de 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, y 90% o más. Para el cálculo de la eficiencia de omisión, se puede hacer referencia a la publicación internacional WO2012/029986.

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

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

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

En la presente invención, la nucleobase incluye, por ejemplo, adenina, guanina, hipoxantina, citosina, timina, uracilo y bases modificadas de los mismos. Ejemplos de tales bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, pseudouracilo, 3-metiluracilo, dihidrouracilo, 5-alquilocitosinas (por ejemplo, 5-metilcitosina), 5-alquiluracilos (por ejemplo,

5-etiluracilo), 5-halouracilatos (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-
 5 dimetilguanina, 3-metilcitosina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5-metilaminometiluracilo, 5-metilcarbonilmetiluracilo, 5-metiloxiuracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, 2-tiocitosina, purina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina,
 10 isoguanina, indol, imidazol, xantina, etc.

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

La modificación de las otras posiciones del azúcar incluye, por ejemplo, la sustitución de O en la posición 4' de la ribosa o desoxirribosa con S, puenteando entre 2' y 4' posiciones del azúcar, por ejemplo, LNA
 20 (ácido nucleico bloqueado) o ENA (2'-O, ácidos nucleicos puenteados a 4'-C-etileno), pero no se limitan a los mismos.

Una modificación de la región de unión a fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de la sustitución de enlace de fosfodiéster con enlace de fosforotioato, enlace de fosforoditioato, enlace de fosfonato de alquilo,
 25 enlace de fosforoamidato o enlace boranofosfato (Enya et al: Bioorganic &

Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (cf., por ejemplo, Re-publicaciones domésticas japonesas de la Solicitud PCT No. 2006/129594 y 2006/038608).

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

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

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

El alcoxi es un alcoxi lineal o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono tales 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 grupo alcoxi que tiene de 1 a 3
20 átomos de carbono.

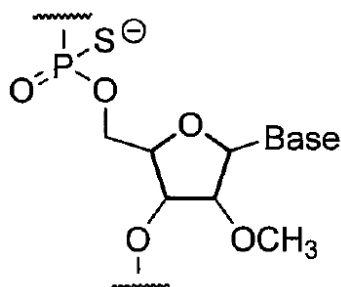
En esta invención, el arilo es preferiblemente un arilo que tiene de 6 a
10 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen fenilo, α -naftilo y β -naftilo. Entre otros, se prefiere fenilo. El arilo puede estar opcionalmente sustituido. Ejemplos de tales sustituyentes son un grupo alquilo, un
25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

uno a tres de dichos sustituyentes.

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

En esta invención, el acilo incluye un alcanoilo lineal o ramificado o aroílo. Ejemplos de alcanoílo incluyen formilo, acetilo, 2-metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, etc. Entre los ejemplos de aroílo incluyen benzoilo, toluoilo y naftoilo. El aroílo puede estar opcionalmente sustituido en posiciones sustituibles y puede estar sustituido con un(os) alquilo(s).

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

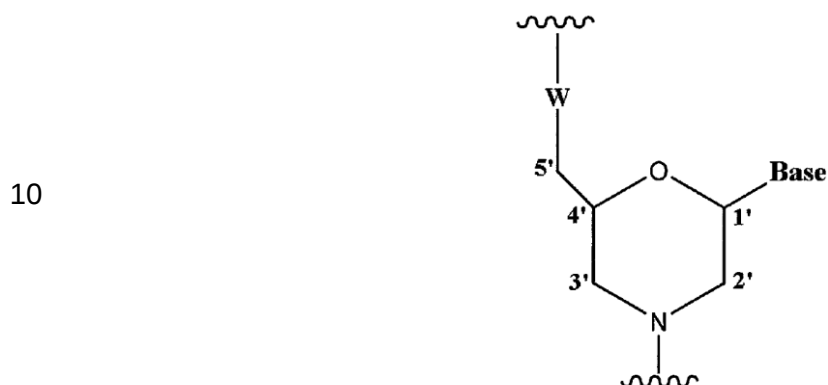


en donde Base representa una nucleobase.

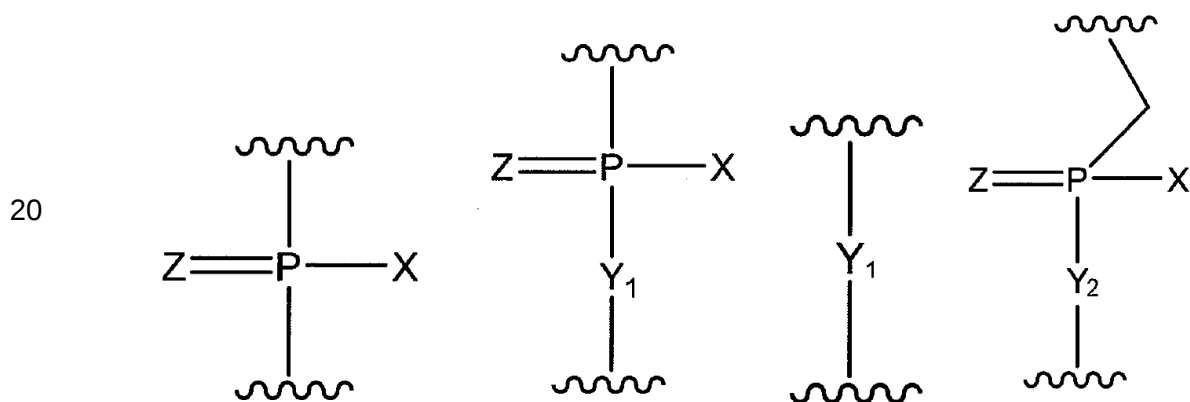
El oligonucleótido de la presente invención se puede sintetizar fácilmente utilizando varios sintetizadores automáticos (por ejemplo,

oligopiloto AKTA plus 10/100 (GE Healthcare)). Como alternativa, la síntesis también puede confiarse a una organización de terceros (por ejemplo, Promega Inc., Takara Co. o Japan Bio Service Co.), etc.

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



en donde Base tiene el mismo significado como se define anteriormente, y W representa un grupo mostrado por 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;
 25 R^1 representa H o un grupo alquilo;

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

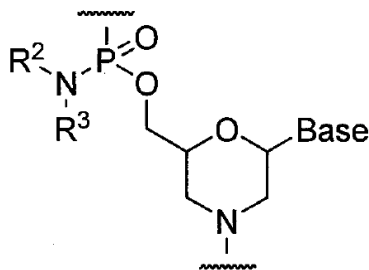
Y_1 representa O, S, CH_2 o NR^1 ;

Y_2 representa O, S o NR^1 ;

5 Z representa O ó S.

Preferiblemente, el oligómero de morfolino es un oligómero que comprende una unidad constituyente representada por la fórmula general a continuación (oligómero de morfolino fosforodiamidato (en lo sucesivo denominado "PMO")).

10



15 en donde Base, R^2 y R^3 tienen el mismo significado como se ha definido anteriormente.

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

Una modificación de la región de unión a fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de la sustitución con enlace de fosforodiamidato, enlace de fosforotioato, enlace de fosforoditioato, enlace de alquilfosfonato, enlace fosforamidato y enlace boranofosfato (Enya et al: Bioorganic &
25 Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (cfr., por ejemplo., re-

publicaciones japonesas de la Solicitud PCT No. 2006/129594 y 2006/038608).

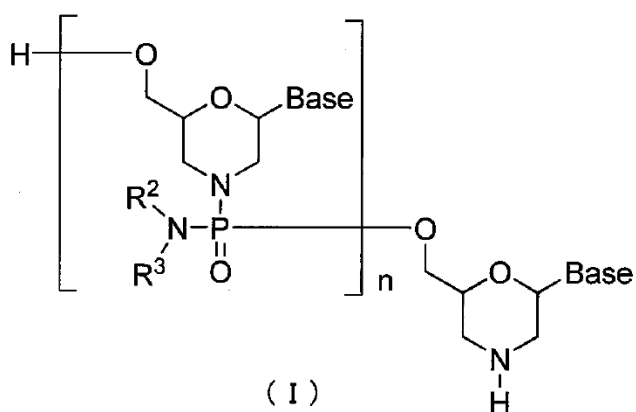
El oligómero de morfolino se puede producir de acuerdo con, por ejemplo, WO 1991/009033 o WO 2009/064471. En particular, PMO se puede producir por el procedimiento descrito en el documento WO 2009/064471 o producidos por el proceso que se muestra a continuación.

Método para fabricar PMO

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

10

15



en donde Base, R^2 y R^3 tienen el mismo significativo como se ha definido anteriormente; y

20

n es un número entero de 1 a 99, preferiblemente un número entero determinado de 24 a 34, 27 31 o 28 a 30, preferiblemente 29.

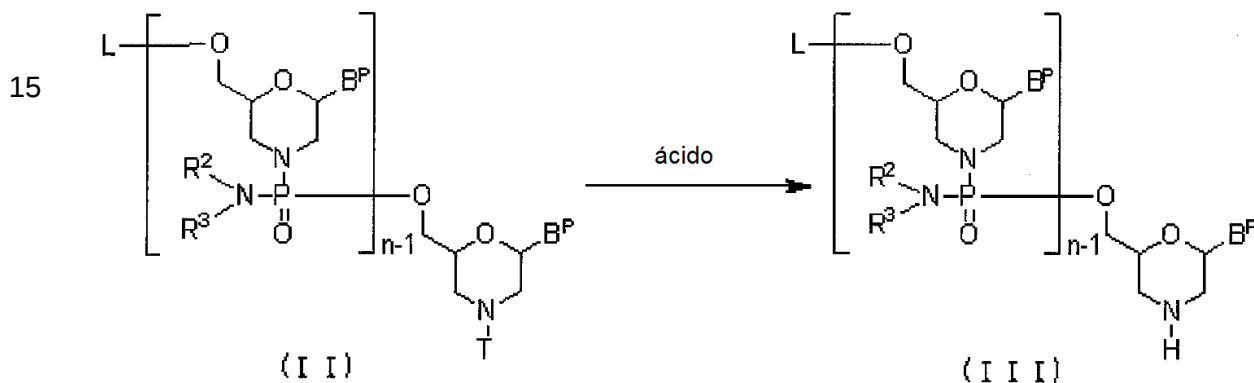
PMO (I) se puede producir de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, se puede producir llevando a cabo los procedimientos en los pasos siguientes.

25

Los compuestos y reactivos utilizados en los pasos siguientes no

Además, los siguientes pasos se pueden llevar a cabo por el método en fase líquida o el método en fase sólida (utilizando manuales o sintetizadores automatizados en fase sólida disponibles en el mercado). Al producir PMO por el método en fase sólida, se desea utilizar sintetizadores automatizados en vista de los procedimientos de operación simple y síntesis exacta.

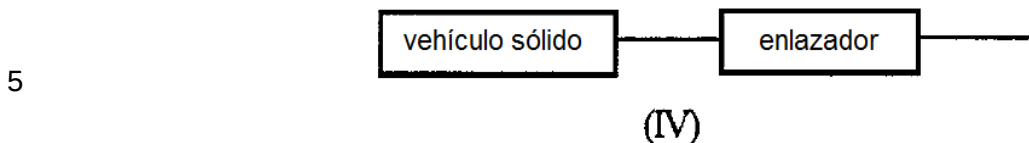
10 El compuesto representado por la fórmula general (II) a continuación (en lo sucesivo, denominado el compuesto (II)) se hace reaccionar con un ácido para preparar el compuesto representado por la fórmula general (III) a continuación (denominado en lo sucesivo Compuesto (III)):



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

25 T representa tritilo, monometoxitritilo o dimetoxitritilo; y,

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



La "núcleobase" para B^P incluye la misma "núcleobase" como parte de la base, siempre y cuando se puede proteger el grupo amino o hidroxilo en la nucleobase mostrado por B^P. Un tal grupo protector para amino no se limita particularmente para que se utilice como un grupo protector para los ácidos nucleicos. Los ejemplos específicos incluyen benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetil, 4-isopropilfenoxiacetil y de (dimetilamino)metileno. Los ejemplos específicos del grupo protector para el grupo hidroxilo incluyen 2-cianoetilo, 4-nitrofenetilo, fenilsulfoniletilo, metilsulfoniletilo y trimetilsililetilo, y fenilo, que puede estar sustituido por grupo aceptor de 1 a 5 electrones en posiciones sustituibles opcionales, difenilcarbamoilo, dimetilcarbamoilo, dietilcarbamoilo, metilfenilcarbamoilo, 1-pirolidinilcarbamoilo, morfolinocarbamoilo, 4-bencil(terc-butilcarboxi), 4-
 15 [(dimetilamino)carboxi]bencilo y 4-(fenilcarboxi)bencilo, (cf., por ejemplo, el documento WO 2009/064471).

El "vehículo sólido" no está particularmente limitado para que sea un vehículo utilizable para la reacción en fase sólida de ácidos nucleicos. Se desea para el vehículo sólido que tenga las siguientes propiedades: por ejemplo, (i) es escasamente soluble en los reactivos que se pueden utilizar
 25

para la síntesis de morfolino derivado de ácidos nucleicos (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, N-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético); (ii) es químicamente estable a los reactivos utilizables para la síntesis de derivados de ácido nucleico de morfolino; (iii) puede ser modificado químicamente; (iv) se puede cargar con derivados de ácido nucleico de morfolino deseados; (v) tiene una resistencia suficiente para soportar la presión alta a través de tratamientos; y (vi) tiene un intervalo de diámetro de partícula uniforme y distribución. Específicamente, el poliestireno hinchable (por ejemplo, resina de aminometil poliestireno 1% divinilbenceno reticulado (malla 200-400) (2.4-3.0 mmol/g) (fabricado por Tokyo Chemical Industry), resina de poliestireno aminometilado·HCl [divinilbenceno 1%, malla 100-200] (fabricado por Peptide Institute, Inc.)), poliestireno no hinchable (por ejemplo, Primer Support (fabricado por GE Healthcare)), poliestireno adjunto 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 de oxalilo (cf., por ejemplo, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol 19, 1527 (1991)), soporte derivatizado de soporte TentaGel-aminopolietileno (por ejemplo, Wright et al., cf., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)) y un copolímero de poliestireno Poros/divinilbenceno.

Un "enlazador", que se puede utilizar es un enlazador conocido en general, utilizado para conectar los ácidos nucleicos o derivados de ácidos nucleicos de morfolino. Los ejemplos incluyen 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dietanolsulfonilo y un amino alquilo de cadena larga (LCAA).

Este paso se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el Compuesto (II) con un ácido.

El "ácido" que se puede utilizar en este paso incluye, por ejemplo, ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético y ácido tricloroacético. El ácido
5 utilizado es apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 0.1 mol equivalente a 1,000 equivalentes molares con base en 1 mol del compuesto (II), preferiblemente en un intervalo de 1 mol equivalente a 100 equivalentes molares basados en 1 mol del Compuesto (II).

Una amina orgánica puede ser utilizada en combinación con el ácido
10 descrito anteriormente. La amina orgánica no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, trietilamina. La cantidad de la amina orgánica utilizada es apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 0.01 mol equivalente a 10 equivalentes molares y preferiblemente en un intervalo de 0.1 mol equivalente a 2 equivalentes molares, basados en 1 mol del ácido.

15 Cuando una sal o la mezcla del ácido y la amina orgánica se utilizan en este paso, la sal o la mezcla incluyen, 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 se puede utilizar en este paso también se puede utilizar
20 en forma de una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%. El solvente no está particularmente limitado en la medida 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.

25 La temperatura de reacción en la reacción descrita anteriormente es

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.

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

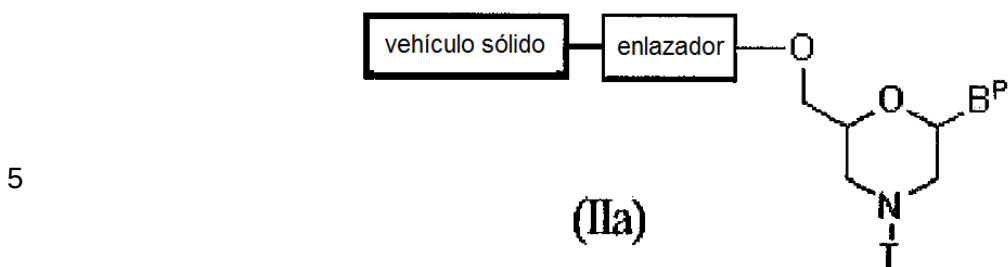
Después de la finalización de este paso, se puede añadir una base, si es necesario, para neutralizar el ácido restante en el sistema. La "base"
10 no está particularmente limitada e incluye, por ejemplo, diisopropilamina. La base también se puede utilizar en forma de una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0.1% (v/v) a 30% (v/v).

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

20 El tiempo de reacción puede variar dependiendo de la clase de la base utilizada y la temperatura de reacción y es adecuada en un intervalo de 0.1 minutos a 24 horas en general y preferentemente en un intervalo de 1 minuto a 5 horas.

En el Compuesto (II), el compuesto de la fórmula general (IIa) como
25 sigue (en lo sucesivo Compuesto (IIa)), en donde n es 1 y L es un grupo

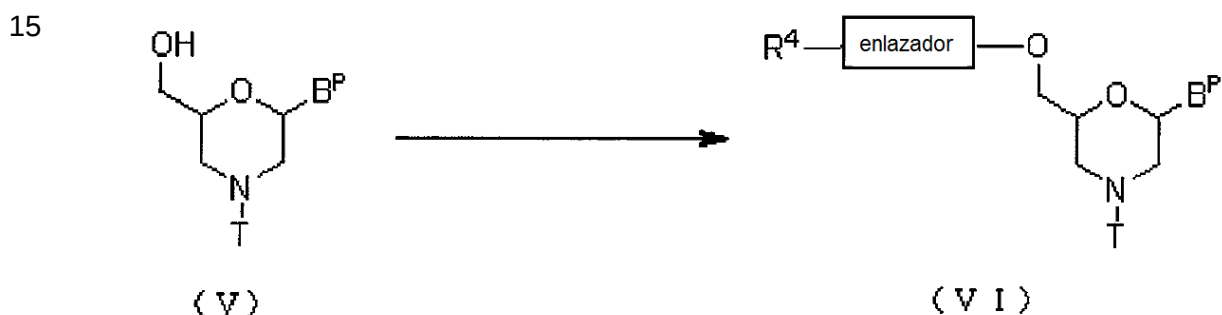
(IV), se puede producir por el siguiente procedimiento.



en donde B^P, T, el enlazador y el vehículo sólido tiene el mismo significativo como se ha definido anteriormente.

10 Etapa 1:

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



20

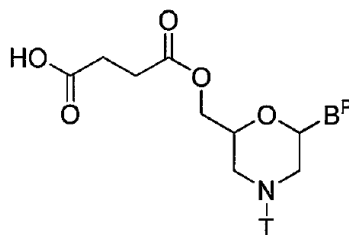
en donde B^P, T y un enlazador tiene el mismo significativo como se define anteriormente y R⁴ representa hidroxilo, un halógeno, grupo carboxilo o amino.

Este paso se puede llevar a cabo mediante procedimientos conocidos para la introducción de enlazadores, usando el Compuesto (V)

25

como material de partida.

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

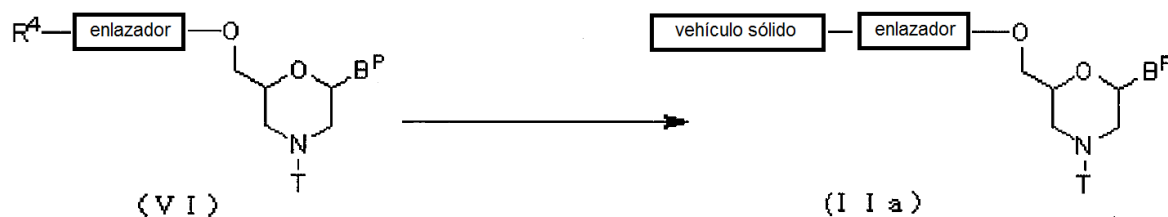


(VI a)

en donde B^P tiene y T tiene el mismo significado como se define anteriormente.

Etapas 2:

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



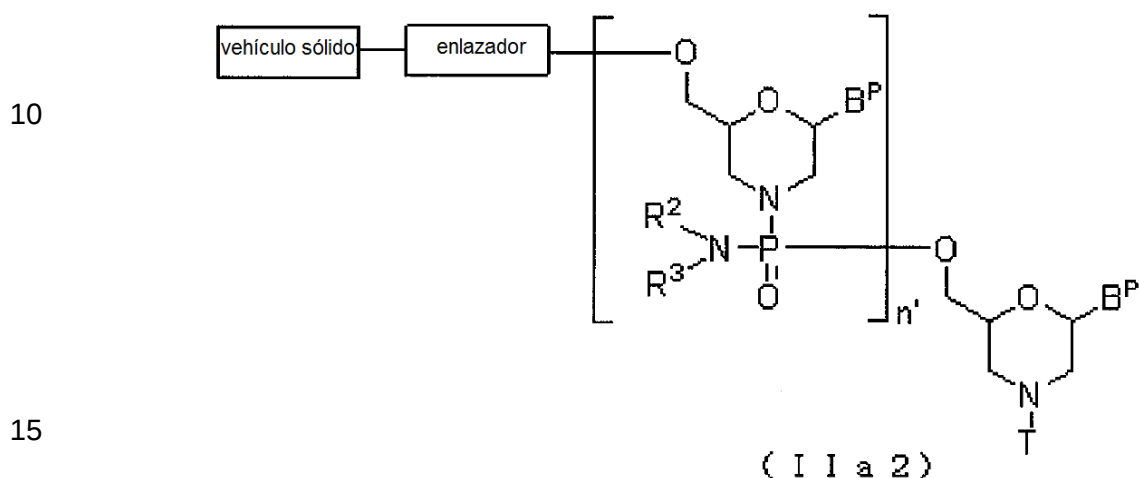
(VI)

(II a)

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

Esta etapa se ha realizado utilizando 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 fórmula general (IIa2) a continuación, en donde n es de 2 a 99 (preferiblemente un número entero determinado de 25 a 35, 28 a 32, o 29 a 31, preferiblemente 30) y L es un grupo representado por la fórmula general (IV) se puede producir mediante el uso del compuesto (IIa) como material de partida y repitiendo la etapa A y la etapa B del método de producción de PMO se describe en la especificación de un número deseado de veces.

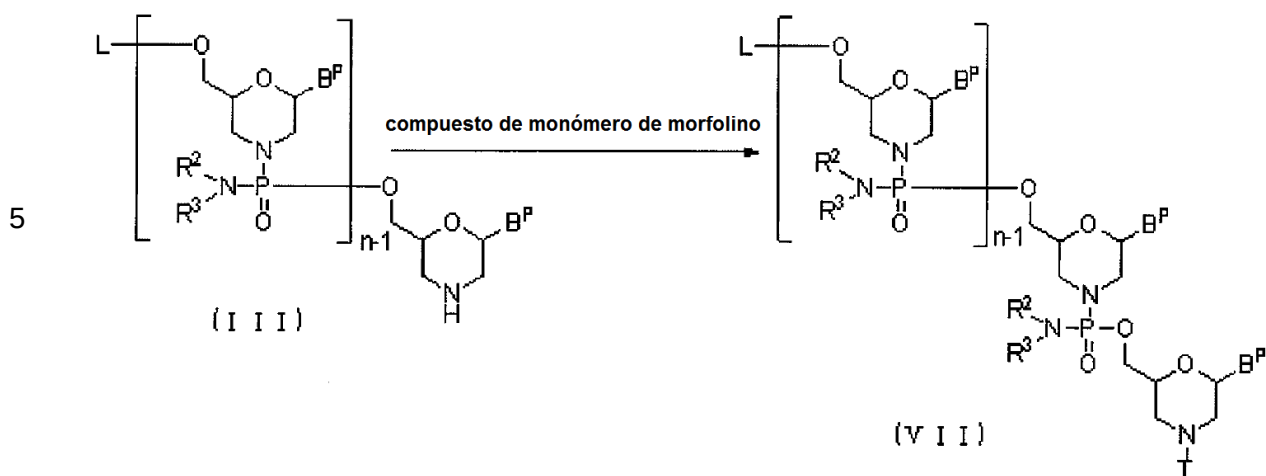


en donde B^P , R^2 , R^3 , T, el enlazador y el vehículo sólido tienen el mismo significado como se ha definido anteriormente; y

n' representa 1 a 98 (en una modalidad específica, n' es 1 a 34, 1 a 33, 1 a 32, 1 a 31, 1 a 30, 1 a 29, 1 a 28, 1 a 27, 1 a 26, 1 a 25, 1 a 24)

(2) Etapa B

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



10

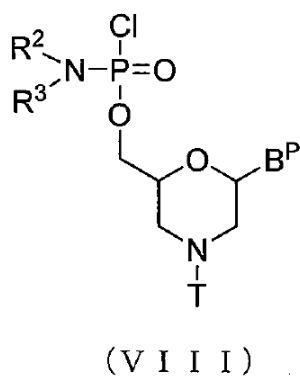
en donde B^P , L , n , R^2 , R^3 y T tienen el mismo significado como se ha definido anteriormente.

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

15

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

20



25 en donde B^P , R^2 , R^3 y T tienen el mismo significado como se ha definido anteriormente.

La "base" que se puede utilizar en esta etapa incluye, por ejemplo, diisopropilamina, trietilamina y N-etilmorfolina. La cantidad de la base utilizada es adecuada en un intervalo de 1 mol equivalente a 1,000 equivalentes molares con base en 1 mol del compuesto (III),
5 preferiblemente, 10 equivalentes molares a 100 equivalentes molares basados en 1 mol del compuesto (III).

El compuesto de monómero de morfolino y la base que se puede utilizar en este paso también se pueden usar como una dilución con un disolvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%. El disolvente
10 no está particularmente limitado para 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
15 50°C.

El tiempo de reacción puede variar dependiendo de la clase de la base utilizada y la temperatura de reacción y es adecuada en un intervalo de 1 minuto a 48 horas en general y preferiblemente en un intervalo de 30 minutos a 24 horas.

20 Además, después de la finalización de esta etapa, se puede agregar un agente de acilación, si es necesario. El "agente de acilación" incluye, por ejemplo, anhídrido acético, cloruro de acetilo y anhídrido fenoxiacético. El agente de acilación también se puede utilizar como una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%.
25 El solvente no está particularmente limitado para que sea inerte a la

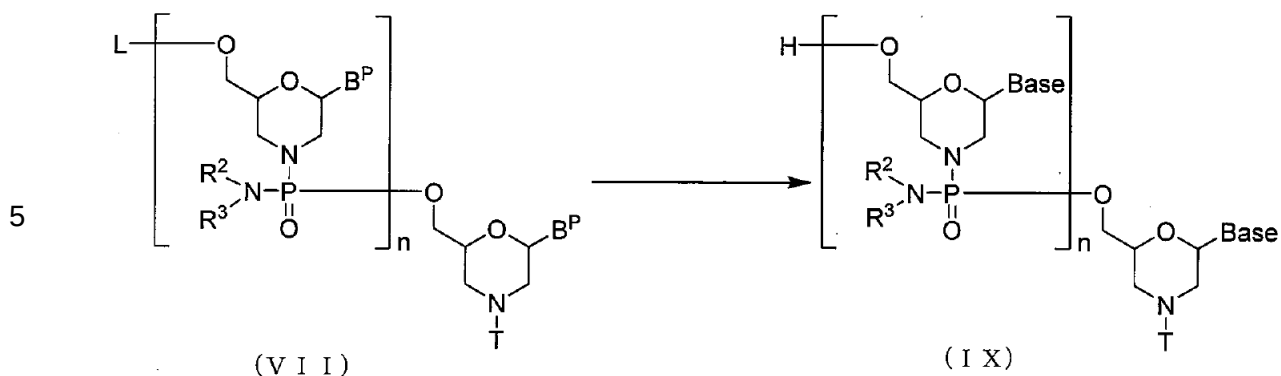
reacción e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua o una mezcla de los mismos.

Si es necesario, una base tal como piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropiletilamina, N-etilmorfolina, etc., también se puede utilizar en combinación con el agente de acilación. La cantidad del agente de acilación es apropiadamente en un intervalo de 0.1 equivalente molar a 10,000 equivalentes molares y preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente molar a 1,000 equivalentes molares. La cantidad de la base es apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 0.1 equivalente molar a 100 equivalentes molares, y preferiblemente en un intervalo de 1 equivalente molar a 10 equivalentes molares, basados en 1 equivalente molar del agente de acilación.

La temperatura de reacción en esta reacción se encuentra preferentemente 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 de la clase de agente de acilación utilizado y la temperatura de reacción y es adecuada 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 elimina 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 significativo
10 como se ha definido anteriormente.

Esta etapa se puede llevar a cabo haciendo reaccionar el Compuesto
(VII) con un agente de desprotección.

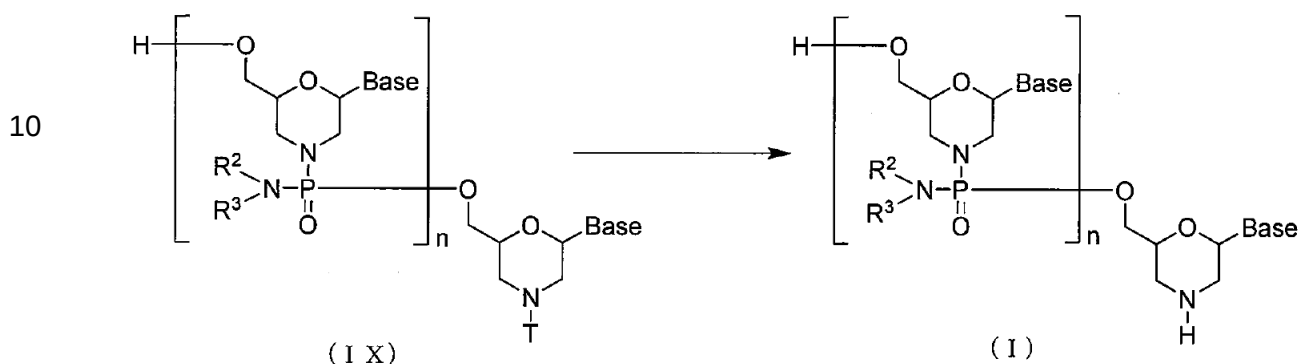
El "agente de desprotección" incluye, por ejemplo, agua de amoníaco
concentrado y metilamina. El "agente de desprotección" utilizado en esta
15 etapa también se puede utilizar como una dilución con, por ejemplo, agua,
metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, DMF,
N,N-dimetilimidazolidona, N-metilpiperidona o una mezcla de éstos
solventes. Entre ellos, se prefiere el etanol. La cantidad del agente de
desprotección usado es apropiadamente en un intervalo de, 1 equivalente
20 molar a 100,000 equivalentes molares y preferiblemente en un intervalo de
10 equivalentes molares a 1,000 equivalentes molares, basados en 1 mol
del compuesto (VII).

La temperatura de reacción es adecuadamente en un intervalo de
15°C a 75°C, preferiblemente, en un intervalo de 40°C a 70°C, y más
25 preferiblemente, en un intervalo de 50°C a 60°C. El tiempo de reacción

para la desprotección puede variar dependiendo de la clase de compuesto (VII), temperatura de reacción, etc., y es apropiada 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.

5 (4) Etapa D:

PMO (I) se produce por reacción del Compuesto (IX) producido en la etapa C con un ácido:



15 en donde Base, n, R², R³ y T tienen el mismo significativo como se ha definido anteriormente.

Esta etapa se puede llevar a cabo agregando un ácido al Compuesto (IX).

20 El "ácido" que se puede utilizar en esta etapa incluye, por ejemplo, ácido tricloroacético, ácido dicloroacético, ácido acético, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, etc. El ácido utilizado se utiliza adecuadamente para permitir que la solución tenga un pH de 0.1 a 4.0 y más preferiblemente, en un intervalo de pH de 1.0 a 3.0. El solvente no está particularmente limitado siempre que sea inerte a la reacción, e incluye, por ejemplo, 25 acetonitrilo, agua o una mezcla de estos solventes de los mismos.

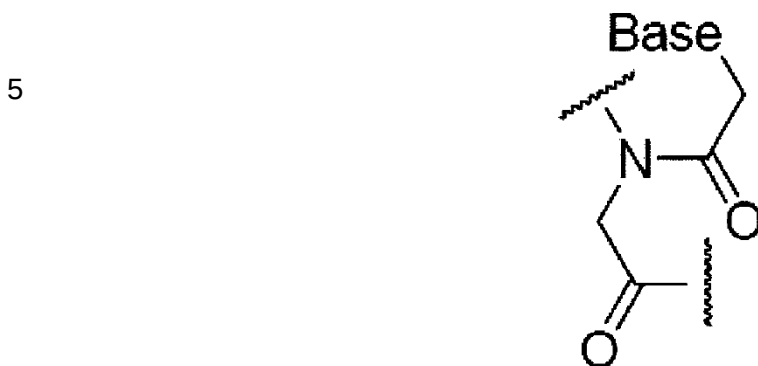
La temperatura de reacción es adecuadamente en un intervalo de 10°C a 50°C, preferiblemente, en un intervalo de 20°C a 40°C y más preferiblemente, en un intervalo de 25°C a 35°C. El tiempo de reacción para la desprotección puede variar dependiendo de la clase de compuesto (IX), temperatura de reacción,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

PMO (I) se puede obtener sometiendo la mezcla de reacción obtenida en esta etapa para los medios convencionales de separación y purificación tales como la extracción, concentración, neutralización, filtración, separación por centrífuga, recristalización, cromatografía en columna en fase inversa C₈ a C₁₈, cromatografía en columna de intercambio de cationes, cromatografía en columna de intercambio aniónico, cromatografía de columna de gel de filtración, cromatografía líquida de alto rendimiento, diálisis, ultrafiltración, etc., solo o en combinación de los mismos. Por lo tanto, el PMO (I) deseado puede ser aislado y purificado (cf., por ejemplo, el documento WO 1991/09033).

En la purificación de PMO (I), usando la cromatografía de fase inversa, por ejemplo, una mezcla en solución de tampón de trietilamina 20 mM/búfer de acetato y acetonitrilo se pueden utilizar como un solvente de elución.

En la purificación de PMO (I) mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo, una mezcla de solución de solución salina 1 M y solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mM se puede utilizar como un solvente de elución.

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



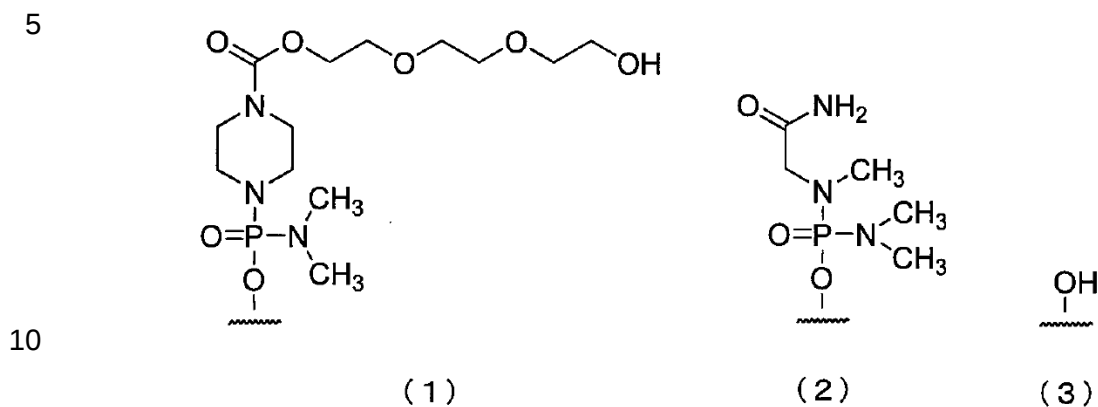
en donde Base tiene el mismo significativo como se ha definido anteriormente.

Los ácidos nucleicos peptídicos se pueden preparar haciendo referencia a las siguientes literaturas.

- 15 1) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg, O. Buchardt, Science, 254, 1497 (1991)
- 2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, Jacs., 114, 1895 (1992)
- 3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994)
- 20 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)
- 25 5) T. Koch, H. F. Hansen, P. Andersen, T. Larsen, H. G. Batz, K.

Otteson, H. Orum, J. Pept. Res., 49, 80 (1997).

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



De aquí en adelante, los grupos mostrados por (1), (2) y (3) anteriores se refieren a "Grupo (1)", "Grupo (2)" y "Grupo (3)", respectivamente.

15 2. Composición farmacéutica

El oligómero de la presente invención causa la omisión del exón 51 con una eficiencia superior en comparación con los oligómeros antisentido de la técnica previa. Por lo tanto, se espera que las condiciones de la distrofia muscular puedan ser aliviados con alta eficiencia mediante la

20 administración de la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención a pacientes con DMD, que tiene la conversión de mutación a en-marco por omisión del exón 51, por ejemplo, pacientes con supresión del exón 29-50, pacientes con supresión del exón 50, los pacientes con supresión del exón 45-50, pacientes con supresión

25 del exón 48-50, pacientes con supresión del exón 49-50, pacientes con

supresión del exón 52, pacientes con supresión de los exones 52 a 63, pacientes con supresión de los exones 13 a 50, pacientes con supresión de los exones 19 a 50, pacientes con supresiones de los exones 43 a 50, o en pacientes con supresión de los exones 47-50. Por ejemplo, cuando se
5 usa la composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención, los mismos efectos terapéuticos se pueden alcanzar incluso en una dosis más pequeña que la de los oligómeros de la técnica previa. De acuerdo con ello, los efectos secundarios pueden ser aliviados y son económicos.

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

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

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

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

25 Ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable del oligómero de la

presente invención contenida en la composición de la presente invención son sales de metales alcalinos tales como sales de sodio, potasio y litio; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio y magnesio; sales metálicas tales como sales de aluminio, hierro, zinc, cobre, níquel, cobalto, etc.; sales de amonio; sales de aminas orgánicas tales como sales de t-octilamina, dibencilamina, morfolina, glucosamina, éster de alquilo de fenilglicina, etilendiamina, N-metilglucamina, guanidina, dietilamina, trietilamina, dicitclohexilamina, N,N'-dibenciletilendiamina, cloroprocaína, procaína, dietanolamina, N-bencilfenetilamina, piperazina, tetrametilamonio, tris(hidroxiometil)aminometano; sales de hidroháluro tales como sales de hidrófluoratos, clorhidratos, bromhidratos y yodhidratos; sales de ácidos inorgánicos tales como nitratos, percloratos, sulfatos, fosfatos, etc.; alcanosulfonatos inferiores tales como metanosulfonatos, trifluorometanosulfonatos y etanosulfonatos; arilsulfonatos tales como bencenosulfonatos y p-toluenosulfonatos; sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, malatos, fumaratos, succinatos, citratos, tartratos, oxalatos, maleatos, etc. y sales de aminoácidos tales como sales de glicina, lisina, arginina, ornitina, ácido glutámico y ácido aspártico. Estas sales se pueden producir por métodos conocidos. Alternativamente, el oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención puede estar en la forma de un hidrato del mismo.

La ruta de administración para la composición de la presente invención no está particularmente limitada siempre y cuando es la ruta farmacéuticamente aceptable para la administración, y se puede elegir dependiendo del método de tratamiento. En vista de la facilidad en la

entrega a los tejidos musculares, se prefiere la administración intravenosa, la administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración oral, administración de tejido, administración transdérmica, etc. Además, las formas de dosificación que están
5 disponibles para la composición de la presente invención no están particularmente limitadas e incluyen, por ejemplo, varias inyecciones, agentes orales, goteos, inhalaciones, pomadas, lociones, etc.

En la administración del oligómero de la presente invención a pacientes con distrofia muscular, la composición de la presente invención
10 puede contener un vehículo para promover el suministro del oligómero a los tejidos musculares. Un tal vehículo no está particularmente limitado siempre que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos incluyen los vehículos catiónicos tales como liposomas catiónicos, polímeros catiónicos, etc., o vehículos utilizando envoltura viral. Los liposomas
15 catiónicos son, por ejemplo, liposomas compuestos de 2-O-(2-dietilaminoetil)carabamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y fosfolípidos como los componentes esenciales (en lo sucesivo, "liposoma A"), Oligofectamine (marca comercial registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectin (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectamine (marca registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), Lipofectamine 2000 (marca
20 registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), DMRIE-C (marca comercial registrada) (fabricado por Invitrogen Corp.), GeneSilencer (marca registrada) (fabricado por Gene Therapy Systems), TransMessenger (marca registrada) (fabricado por QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (marca
25 registrada) (fabricado por Mirus) y Nucleofector II (Lonza). Entre otros, se

prefiere el liposoma A. Los ejemplos de polímeros catiónicos son JetSI (marca registrada) (fabricado por Qbiogene, Inc.) y Jet-PEI (marca registrada) (polietilenimina, fabricado por Qbiogene, Inc.). Un ejemplo de los vehículos que utilizan envoltura viral es GenomeOne (marca registrada) (liposoma HVJ-E, fabricado por Ishihara Sangyo). Alternativamente, los dispositivos médicos descritos en la patente japonesa No. 2924179 y los vehículos catiónicos descritos en la re-publicación doméstica japonesa Nos. 2006/129594 y 2008/096690 se pueden utilizar también. Para más detalles, se puede hacer referencia a la patente de EE.UU. No. 4,235,871, la patente de EE.UU. No. 4,737,323, WO96/14057, "New RRC, Liposomes: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1990) páginas 33 a 104", etc.

Una concentración del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención puede variar dependiendo de la clase del vehículo, etc., y es adecuada en un intervalo de 0.1 nM a 100 μ M, preferiblemente en un intervalo de 100 nM a 10 μ M. Una relación en peso del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención y el vehículo (vehículo/oligómero antisentido de la presente invención) puede variar dependiendo de la propiedad del oligómero, el tipo del vehículo, etc., y es apropiadamente en un intervalo de 0.1 a 100, preferiblemente en un intervalo de 0.1 a 10.

Además, del oligómero de la presente invención y el vehículo descrito anteriormente, también se pueden formular aditivos farmacéuticamente aceptables opcionalmente en la composición de la presente invención. Ejemplos de tales aditivos son soportes de emulsificación (por ejemplo, ácidos grasos que tienen de 6 a 22 átomos de

carbono y sus sales farmacéuticamente aceptables, albúmina y dextrano), estabilizadores (por ejemplo, colesterol y ácido fosfatídico), agentes isotonizantes (por ejemplo, cloruro de sodio, glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa) y agentes de control de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y trietanolamina). Uno o más de estos aditivos se pueden utilizar. El contenido de aditivo en la composición de la presente invención es adecuadamente 90% en peso o menos, preferiblemente 70% en peso o menos y más preferiblemente, 50% en peso o menos.

La composición de la presente invención se puede preparar agregando el oligómero de la presente invención a una dispersión de vehículo y agitar adecuadamente la mezcla. Los aditivos se pueden agregar en una etapa apropiada antes o después de la adición del oligómero de la presente invención. Un solvente acuoso que se puede utilizar en la adición el oligómero de la presente invención no está particularmente limitado siempre que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos son agua inyectable o agua destilada inyectable, líquido de electrolito tal como solución salina fisiológica, etc. y el líquido de azúcar tal como fluido de glucosa, fluido de maltosa, etc. Un experto en la técnica puede elegir apropiadamente las condiciones de pH y temperatura para dicha materia.

La composición de la presente invención se puede preparar en, por ejemplo, una forma líquida y su preparación liofilizada. La preparación liofilizada se puede preparar por liofilización de la composición de la

presente invención en una forma líquida de una manera convencional. La liofilización se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante la esterilización apropiada de la composición de la presente invención en una forma líquida, dispensar una parte alícuota en un recipiente vial, llevar a cabo
5 una congelación preliminar durante 2 horas en condiciones de aproximadamente -40 a -20°C, realizando un secado primario a aproximadamente 0 a 10°C bajo presión reducida y, a continuación, realizar un secado secundario a aproximadamente 15 a 25°C bajo presión reducida. En general, la preparación liofilizada de la composición de la
10 presente invención se puede obtener mediante la sustitución del contenido del vial con gas nitrógeno y taponado.

La preparación liofilizada de la composición de la presente invención se puede utilizar, en general, después de la reconstitución mediante la adición de una solución adecuada opcional (líquido de reconstitución) y
15 redisolución de 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 en función del uso previsto, etc., no está particularmente limitado y es adecuadamente de 0.5 a 2 veces mayor que el volumen antes de la liofilización o no más de 500
20 mL.

Se desea controlar una dosis de la composición de la presente invención a administrar, mediante la adopción de los siguientes factores: el tipo y la dosis del oligómero de la presente invención contenida; condiciones de los pacientes incluyendo la edad, peso corporal, etc.; ruta
25 de administración y las características y el alcance de la enfermedad. Una

dosis diaria calculada como la cantidad del oligómero antisentido de la presente invención está generalmente en un intervalo de 0.1 mg a 10 g/humano y preferiblemente de 1 mg a 1 g/humano. Este rango numérico puede variar ocasionalmente dependiendo del tipo de la molécula de la enfermedad objetivo, la ruta de administración y de destino. Por lo tanto, una dosis menor al intervalo puede ser suficiente en alguna ocasión y por el contrario, una dosis mayor que el rango puede ser necesario ocasionalmente. La composición se puede administrar de una a varias veces al día o a intervalos de un día a varios días.

Aún en otra modalidad 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 soporte descrito anteriormente. Un tal vector de expresión puede ser un vector capaz de expresar una pluralidad de los oligonucleótidos de la presente invención. La composición se puede formular con aditivos farmacéuticamente aceptables como en el caso de la composición de la presente invención que contiene el oligómero de la presente invención. Una concentración del vector de expresión contenido en la composición puede variar dependiendo del tipo del vehículo, etc., y es adecuada en un intervalo de 0.1 nM a 100 μ M, preferiblemente en un intervalo de 100 nM a 10 μ M. Una relación en peso 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 del vehículo, etc., y es apropiadamente en un intervalo de 0.1 a 100, preferiblemente en un intervalo de 0.1 a 10. El contenido del vehículo contenido en la

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

- 5 De aquí en adelante, la presente descripción se describirá con más detalle con referencia a los Ejemplos y los Ejemplos de prueba a continuación, pero no se deben limitar a los mismos.

Ejemplos

Ejemplos 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 amino poliestireno

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

- 15 En atmósfera de argón, 3.44 g de N-{1-[(2R, 6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida y 1.1 g de 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) se suspendieron en 50 mL de diclorometano y se agregaron 0.90 g de anhídrido succínico a la suspensión, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. A la mezcla de reacción
- 20 se agregaron 10 mL de metanol y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo usando acetato de etilo y la solución de dihidrógenofosfato de potasio acuoso 0.5 M. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con solución 0.5 M de dihidrógenofosfato potasio acuoso, agua y salmuera en el orden mencionado. La capa orgánica
- 25 resultante se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión

reducida para obtener 4.0 g del producto.

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

5 Después de 4.0 g de 4-[[[(2S, 6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico se disolvió en 200 mL de piridina (deshidratado), se agregaron 0.73 g de 4-DMAP y 11.5 g de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida a la solución. Posteriormente, se agregaron 25.0 g de resina de amino poliestireno

10 Primer support 200 amino (fabricado por GE Healthcare Japan Co., Ltd., 17-5214-97) y 8.5 mL de trietilamina a la mezcla, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 4 días. Después de la terminación de la reacción, la resina se retira por filtración. La resina resultante se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano en el orden

15 mencionado y se secó a presión reducida. A la resina resultante se agregaron 200 mL de tetrahidrofurano (deshidratado), 15 mL de anhídrido acético y 15 mL de 2,6-lutidina, y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se retiró por filtración, se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano en el orden

20 mencionado y se secó bajo presión reducida para obtener 26.7 g del producto.

Se determinó la cantidad de carga del producto de la cantidad molar de tritilo por g de resina midiendo la absorbancia UV a 409 nm usando un método conocido. La cantidad de carga de la resina fue 192.2 mol/g.

25 Condiciones de medición de UV

Aparato: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Solvente: ácido metanosulfónico

Longitud de onda: 265 nm

Calor del ε: 45,000

5 De acuerdo con las descripciones en los Ejemplos 1, 2 y Ejemplo de referencia 1 a continuación, se sintetizaron PMO mostrado por el PMO Nos. 1-3 en la Tabla 1. El PMO sintetizado se disolvió en agua inyectable (fabricado por Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.).

Tabla 1

10

PMO No.	Note	SEC ID NO:
1	Extremo 5': grupo (3)	1
2	Extremo 5': grupo (3)	2
3	Secuencia que corresponde a la SEC ID NO; 588 en el Documento de Patente 3, Extremo 5': grupo (3)	4

15

Ejemplo 1

PMO No. 1

0.2 g de ácido 4-{[(2S, 6R)-6-(4-benzamida-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico soportado en una resina de aminopoliestireno (Ejemplo de Referencia 1) (26 μmol) se cargó en una columna con una punta de filtro. Posteriormente, el ciclo de síntesis mostrada a continuación se ha iniciado utilizando una máquina de síntesis de ácido nucleico (AKTA OligoPilot 10 plus). Se agregó el compuesto de monómero de morfolino deseado en cada ciclo de acoplamiento para
20
25 obtener la secuencia de nucleótidos del compuesto del título (ver la Tabla

2 a continuación).

Tabla 2

5	Etapa	Reactivo	Volumen (mL)	Tiempo (min)
	1	Solución de desbloqueo	18-32	1.8-3.2
	2	Solución de neutralización y lavado	30	1.5
	3	Solución de acoplamiento B	5	0.5
	4	Solución de acoplamiento A	1.3	0.25
10	5	Reacción de acoplamiento por los reactivos agregados en las etapas 3 y 4		120-300
	6	Acetonitrilo	20	1.0
	7	Solución de taponado	9	2.0
	8	Acetonitrilo	30	2.0

La solución de desbloqueo utilizada fue solución de diclorometano que contiene 3% (p/v) de ácido trifluoroacético. La solución de neutralización y lavado usada fue una solución obtenida mediante la disolución de N,N-diisopropiletilamina al 10% (v/v) y tetrahydrofurano al 5% (v/v) en diclorometano que contiene 35% (v/v) de acetonitrilo. La solución de acoplamiento A usada fue una solución obtenida disolviendo el compuesto de monómero de morfolino en tetrahydrofurano al 0.10 M. La solución de acoplamiento B utilizada fue una solución obtenida mediante la disolución de N,N-diisopropiletilamina al 20% (v/v) y tetrahydrofurano al 10% (v/v) en acetonitrilo. La solución de taponado utilizada fue una solución obtenida mediante la disolución de 20% (v/v) de anhídrido acético y 30% (v/v) de 2,6-lutidina en acetonitrilo.

La resina de aminopoliéstereno cargada con el PMO sintetizado anteriormente se recuperó del recipiente de reacción y se secó a

temperatura ambiente durante al menos 2 horas a presión reducida. El PMO seco cargado en resina de aminopoliestireno se cargó en un recipiente de reacción y se agregaron 5 mL de 28% de amoníaco en agua - etanol (1/4) a la misma. La mezcla se agitó a 55°C durante 15 horas. La resina de aminopoliestireno se separó por filtración y se lavó con 1 mL de agua-etanol (1/4). El filtrado resultante se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 10 mL de una mezcla solvente de 20 mM de ácido acético - tampón de trietilamina (búfer TEAA) y 10 mL de acetonitrilo (4/1) y se filtró a través de un filtro de membrana. El filtrado obtenido se purificó por HPLC de fase inversa. Las condiciones utilizadas son como se muestra en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3

15	Columna	XBridge 5 μ m C18 (Waters, ϕ 19×50 mm, 1 CV=14 mL)
	Velocidad de flujo	10 mL/min
	Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
	Solución A	Búfer 20mM TEAA
	Solución B	CH ₃ CN
	Gradiente	(B) conc. 10→70% /15 CV

CV: volumen de columna

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

La solución acuosa resultante que contiene el producto objetivo se purificó por una columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones utilizadas son como se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4

5	Columna	Source 15Q (GE Healthcare, $\phi 10 \times 108$ mm, 1 CV=8.5 mL)
	Velocidad de flujo	8.5 mL/min
	Temperatura de columna	Temperatura ambiente
	Solución A	Solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mM
	Solución B	Solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mM, solución de cloruro de sodio 1 M
10	Gradiente	(B) conc. 1 $\rightarrow$ 50% / 40CV

Cada fracción se analizó (en HPLC) y el producto objetivo se obtuvo como una solución acuosa. A la solución acuosa resultante se agregó búfer de fosfato 0.1 M (pH 6.0) para neutralización. Posteriormente, la mezcla obtenida se desmineralizó por HPLC de fase inversa en las condiciones

15 descritas en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5

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

El producto objetivo se recuperó y la mezcla se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en agua. La solución acuosa

25 obtenida se liofilizó para obtener el compuesto objetivo como un sólido

similar a algodón blanco.

ESI-TOF-MS Clcd.: 10021.46
Encontrado: 10021.91

5 Ejemplo 2

PMO No. 2

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

ESI-TOF-MS Clcd.: 9916.71

10 Encontrado: 9916.43

Ejemplo comparativo 1

PMO No. 3

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

15 ESI-TOF-MS Clcd.: 9949.46

Encontrado: 9949.41

Ejemplo de prueba 1

Ensayo *in vitro*

20 Los experimentos se realizaron utilizando los oligómeros antisentido PMO Números 1 y 2 de la presente invención y el oligómero antisentido PMO No. 3. Las secuencias de varios oligómeros antisentido se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Secuencia de nucleótidos	PMO No.
CGGTAAGTTCTGTCCTCAAGGAAGATGGCA	1
CTCATACCTTCTGCTTCAAGGAAGATGGCA	2
CTCCAACATCAAGGAAGATGGCATTCTAG	3

5

Utilizando un Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L en Nucleofector II (Lonza), 0.3, 1, 3, 10 μ M de los oligómeros PMO Nos. 1 y 2 de la presente invención y el oligómero antisentido No. 3 se transfectaron con 3.5×10^5 de células RD (línea celular de rhabdomyosarcoma humano). Se utilizó el programa T-030.

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

El RT-PCR de una etapa se realizó con 400 ng del ARN total extraído usando un Qiagen One Step RT-PCR Kit (fabricado por Qiagen). Una solución de reacción se preparó de acuerdo con el protocolo adjunto

25

al kit. Un PTC-100 (fabricado por MJ Research) se utilizó como un ciclador térmico. El programa de RT-PCR utilizada es la siguiente.

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

95°C, 15 minutos: desnaturalización térmica

5 [94°C, 30 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 60 segundos] x 35
ciclos: amplificación por PCR

72°C, 10 minutos: extensión final

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

10 Cebador directo: 5'-CTGAGTGGAAGGCGGTAAAC-3' (SEC ID NO:
5)

Cebador inverso: 5' GAAGTTTCAGGGCCAAGTCA-3' (SEC ID NO:
6)

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

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

Resultados experimentales

Los resultados de muestran en la figura 1. Este experimento reveló que los oligómeros antisentido de la presente invención podría causar la omisión del exón 51 con una eficiencia notablemente mayor que el
25 oligómero antisentido PMO No. 3.

Ejemplo 3

PMO No. 4-6

El compuesto del título se produjo de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1. Las secuencias de varios oligómeros antisentido se muestran a continuación.

Tabla 7

10

PMO No.	Secuencia	ESI-TOF-MS		Note	SEC ID NO
		MW	Encontrado		
4	AACATCAAGGAAGATGGCATT	7007.96	7007.97	Extremo 5': grupo (3)	7
5	TCCAACATCAAGGAAGATGGC	6968.97	6968.42	Extremo 5': grupo (3)	8
6	ACCTCCAACATCAAGGAAGAT	6912.91	6912.85	Extremo 5': grupo (3)	9

Ejemplo 4

2'-O-metoxi-fosforotioatos mostrados por la SEC ID NO: 9 a 33

Varios oligómeros antisentido del título se produjeron con la ayuda de Japan Bio Service Co. La secuencia de oligómeros antisentido se muestran en la Tabla 8.

20

25

Secuencia No.	Secuencia	ESI-TOF-MS	
		MW	Encontrado
10	GAGUAACAGUCUGAGUAGGAG	7453	7452.876
11	UGUGUCACCAGAGUAACAGUC	7310	7313.793
12	AACCACAGGUUGUGUCACCAG	7309	7311.199
13	UUUCCUUAGUAACCACAGGUU	7209	7211.436
14	GAGAUGGCAGUUUCCUUAGUA	7328	7331.388
15	UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	7345	7347.440
16	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	7329	7329.982
17	AACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	7381	7381.059
18	AGGUACCUCCAACAUCAAGGA	7316	7318.395
19	CUGCCAGAGCAGGUACCUCCA	7284	7286.932
20	CGGUUGAAAUCUGCCAGAGCA	7349	7351.895
21	UGUCCAAGCCCGGUUGAAAUC	7286	7286.00
22	CGGUAAGUUCUGUCCAAGCCC	7262	7262.929
23	GAAAGCCAGUCGGUAAGUUCU	7350	7351.869
24	AUCAAGCAGAGAAAGCCAGUC	7379	7378.383
25	UUAUAACUUGAUCAAGCAGAG	7319	7320.149
26	CUCUGUGAUUUUAUAACUUGA	7211	7212.295
27	CACCAUCACCCUCUGUGAUUU	7144	7145.555
28	CAAGGUCACCCACCAUCACCC	7187	7187.709
29	UUGAUAUCCUCAAGGUCACCC	7207	7210.071
30	GAUCAUCUCGUUGAUAUCCUC	7185	71882.39
31	UCUGCUUGAUGAUCAUCUCGU	7202	7203.926
32	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	7346	7346.562
33	CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	7375	7375.678
34	CCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	7317	7318.343

Aplicabilidad industrial

Los resultados experimentales en los Ejemplos de prueba demuestran que los oligómeros de la presente invención causaron la omisión del exón 51 con una eficiencia notablemente alta en células RD. Por lo tanto, los oligómeros de la presente invención son extremadamente útiles para el tratamiento de la DMD.