COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE EL OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENSO Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a la dosificación y administración de un oligómero antisentido capaz de omitir el exón 53 de un gen de distrofina humana, y una composición farmacéutica que comprende el oligómero.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0002] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la atrofia muscular progresiva hereditaria que ocurre con mayor frecuencia, y la DMD afecta aproximadamente a uno de cada 3500 niños al nacer. En la infancia, los pacientes con DMD exhiben funciones motoras que son casi las mismas que las de los humanos sanos, pero se observa debilidad muscular alrededor de los cuatro o cinco años. Luego, la debilidad muscular progresa y la mayoría no puede caminar a la edad de 12 años. Los pacientes mueren debido a insuficiencia cardíaca o insuficiencia respiratoria a los 20 años. Por tanto, la DMD es una enfermedad muy grave. En la actualidad, no existen métodos terapéuticos eficaces para la DMD y, por tanto, se ha deseado fuertemente desarrollar un nuevo agente terapéutico.

[0003] Se sabe que la DMD es causada por una mutación de un gen de la distrofina. El gen de la distrofina es un gen

enorme que consta de ADN de 2.200.000 pares de bases, que existe en el cromosoma X. El ADN se transcribe en un precursor de ARNm, y luego los intrones se eliminan por empalme, de modo que se sintetiza ARNm que contiene 79 exones. A partir de este ARNm se traducen 3.685 aminoácidos, de modo que se genera una proteína distrofina. La proteína distrofina está asociada con el mantenimiento de la estabilidad de la membrana de las células musculares y es necesaria para prevenir la destrucción de las células musculares. Dado que el gen de la distrofina de los pacientes con DMD tiene una mutación, apenas se expresa una proteína distrofina que funciona en las células musculares. Por lo tanto, en el cuerpo de los pacientes con DMD, la estructura de las células musculares no se puede mantener y una gran cantidad de iones de calcio fluye hacia las células musculares. Como resultado, se produce una reacción similar a la inflamación, la fibrosis progresa y, por lo tanto, las células musculares no se regeneran.

[0004] La distrofia muscular de Becker (DMO) también es causada por una mutación de un gen de la distrofina. Los síntomas de la DMO también presentan debilidad muscular debido a la atrofia muscular, pero los síntomas de la debilidad muscular son generalmente más leves que los de la DMD y la debilidad muscular progresa lentamente. En la

mayoría de los casos, la DMO se desarrolla en la edad adulta. Se ha considerado que tales diferencias en los síntomas clínicos entre DMD y BMD son causadas por si el marco de lectura de aminoácidos se destruye debido a una mutación o se mantiene cuando el ARNm de la distrofina se traduce en una proteína distrofina (literatura no de patente 1). Es decir, en la DMD, hay una mutación de desplazamiento del marco de lectura de aminoácidos y, por lo tanto, casi no se expresan proteínas distrofinas funcionales. Por otro lado, en la DMO, aunque se eliminan algunos exones por mutación, se mantiene el marco de lectura de aminoácidos y así se generan proteínas distrofinas funcionales, aunque la función es insuficiente.

[0005] Como método terapéutico para la DMD, se espera un método de omisión de exón. De acuerdo con este método, el marco de lectura de aminoácidos del ARNm de la distrofina se restaura modificando el corte y empalme, y se induce la expresión de una proteína distrofina que tiene una función parcialmente recuperada (literatura no de patente 2). La parte de la secuencia de aminoácidos como objetivo de la omisión de exón se pierde. Como tal, la proteína distrofina expresada como resultado de este tratamiento se vuelve más corta que una proteína distrofina normal. Sin embargo, dado que se mantiene el marco de lectura de aminoácidos, la función de estabilizar las células musculares se conserva

parcialmente. Por consiguiente, se espera que, como resultado de la omisión de exón, la DMD llegue a presentar síntomas similares a los de una DMO más leve. El método de omisión de exón se ha sometido a experimentos con animales con ratones o perros, y ahora se realizan estudios clínicos en pacientes humanos con DMD.

[0006] La omisión de exón puede inducirse mediante la unión de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a uno o ambos sitios de corte y empalme 5’ y 3', o el interior de un exón. El exón se incluye en el ARNm, solo cuando ambos sitios de empalme son reconocidos por un complejo de espliceosoma. Por consiguiente, al dirigirse a los sitios de corte y empalme con ácidos nucleicos antisentido, se puede inducir la omisión de exón. Además, para reconocer el exón por el mecanismo de corte y empalme, se ha considerado necesario que la proteína SR se una a un potenciador de corte y empalme de exón (ESE), y la omisión de exón también puede inducirse dirigiendo la ESE.

[0007] La mutación del gen de la distrofina es diferente según los pacientes con DMD individuales. Por tanto, son necesarios ácidos nucleicos antisentido personalizados dependiendo de la posición o el tipo de mutación genética. Hasta la fecha, han sido producidos ácidos nucleicos antisentido que inducen el salto de exón a los 79 exones, por

Steve Wilton et al., en la Universidad de Australia Occidental (Literatura No Patentada 3), y también, han sido producidos ácidos nucleicos antisentido que inducen el salto de exón a 39 exones, por Annemieke Aartsma-Rus et al., en los Países Bajos (Literatura No Patentada 4).

[0008] Se ha considerado que aproximadamente el 10% del total de pacientes con DMD puede tratarse omitiendo el exón 53 (en lo sucesivo denominado "exón 53"). En los últimos años, varias instituciones de investigación han informado de estudios sobre la omisión del exón del exón 53 de un gen de la distrofina (Literaturas De Patentes 1 a 4; y Literatura No Patente 5 y 6).

Lista de Citas

[0009] **Literatura de Patentes**:

Literatura de Patentes 1: Publicación Internacional No. WO 2006/000057

Literatura de Patentes 2: Publicación Internacional No. WO 2004/048570

Literatura de Patentes 3: Publicación de Patente de EE. UU. Abierta al Público No. US 2010/0168212

Literatura de Patentes 4: Publicación Internacional No. WO 2010/048586

[0010] **Literatura No Patente:**

Literatura No Patente 1: Monaco A. P. et al., Genomics 1988;

2: págs.90-95

Literatura No Patente 2: Matsuo M., Brain Dev 1996; 18: págs.167-172

Literatura No Patente 3: Wilton S. D. et al., Molecular Therapy 2007:15: págs. 1288-96

Literatura No Patente 4: Annemieke Aartsma-Rus et al., (2002) Neuromuscular Disorders 12: S71-S77

Literatura No Patente 5: Linda J. Popplewell et al., (2010) Neuromuscular Disorders, vol. 20, no. 2, págs.102-10

Literatura No Patente 6: Bladen C. L. et al., Human Mutation (2015) 36:395-402

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

[0011] La presente invención es la siguiente, pero no se limita a ella.

<1>

Una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente humano con distrofia muscular de Duchenne, la composición farmacéutica que comprende un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consiste en nucleótidos en las posiciones 36 a 56 de la terminal 5’ del exón 53 de una distrofina humana. gen, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, donde

el tratamiento comprende la administración intravenosa al paciente humano del oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo en una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive.

<2>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, en la que el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, se administra por vía intravenosa al paciente humano a una dosis de 40 mg/kg/semana.

<3>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, en la que el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, se administra por vía intravenosa al paciente humano a una dosis de 80 mg/kg/semana.

<4>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, en la que el paciente humano tiene una mutación que da como resultado una deficiencia de cualquier exón seleccionado del grupo que consiste en los exones 43-52, 45-52, 47-52, 48-52, 49. -52, 50-52 o 52, en un gen de distrofina.

<5>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, en la que la expresión de una proteína distrofina en el paciente humano antes del tratamiento es del 1% o menos en comparación con la de un sujeto sano, medida por Western Blot o espectrometría de masas.

<6>

La composición farmacéutica de acuerdo con los 5 anteriores, en la que la expresión de una proteína distrofina no se encuentra en el paciente humano antes del tratamiento.

<7>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, en la que la secuencia de bases del oligómero antisentido consiste en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3.

<8>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, en la que el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, es Viltolarsen o un equivalente del mismo.

<9>

La composición farmacéutica según el anterior <1>, que comprende el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, en una concentración de entre 2.5 mg/ml inclusive y

500 mg/ml inclusive, o entre 10 mg/ml. ml inclusive y 100 mg/ml inclusive.

<10>

La composición farmacéutica según el anterior <1>, que comprende el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, en una concentración de 25 mg/ml.

<11>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, que comprende el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, en una concentración de 50 mg/ml.

<12>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, que comprende además al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un agente de tonicidad, un ajustador de pH y un disolvente.

<13>

La composición farmacéutica de acuerdo con los 12 anteriores, en la que el agente de tonicidad es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de potasio, glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, lactosa, manitol, sorbitol, xilitol, trehalosa y glicerina.

<14>

La composición farmacéutica según los 12 o 13 anteriores, en la que el ajustador de pH es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en ácido clorhídrico, hidróxido de sodio, ácido cítrico, ácido láctico, fosfato (hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de y dihidrogenofosfato de potasio) y monoetanolamina.

<15>

La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de los 12 a 14 anteriores, en la que el disolvente es agua.

<16>

La composición farmacéutica según el anterior <1>, que comprende el oligómero antisentido en una concentración de entre 2.5 mg/ml inclusive y 500 mg/ml inclusive, o entre 10 mg/ml inclusive y 100 mg/ml inclusive, y cloruro de sodio en una concentración entre 8 mg/ml inclusive y 10 mg/ml inclusive, y que es una solución acuosa con pH de 7.2 a 7.4.

<17>

La composición farmacéutica según el anterior <1>, en la que el tratamiento proporciona al menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en los siguientes efectos (1) a (6):

(1) el valor medio del nivel de expresión de una proteína distrofina en el músculo esquelético del paciente

aumenta 9 veces o más en comparación con el valor inicial, después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(2) un cambio en la velocidad obtenida desde el tiempo de reposo (TTSTAND) es de -0.055 veces/seg o más en comparación con la línea de base, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(3) un cambio en la velocidad obtenida a partir del tiempo para correr/caminar 10 metros (TTRW) es de -0.025 metros/seg o más en comparación con la línea de base, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(4) un cambio en la velocidad obtenida a partir del tiempo para subir 4 escaleras (TTCLIMB) es de -0.060 veces/seg o más en comparación con la línea de base, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(5) un cambio en la puntuación de la Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA) es -2.2 puntuaciones o más en comparación con el valor inicial, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas; y

(6) un cambio en la prueba de marcha de 6 minutos (6MWT)

es de -7.5 metros o más en comparación con el valor inicial, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas.

<18>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, donde cuando el tratamiento se realiza en pacientes humanos de 7 a 9 años con distrofia muscular de Duchenne durante 84 semanas, al menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en los siguientes efectos (1) a (6) se proporciona:

(1) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de aumento es menos del 20% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(2) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad para subir 4 escalones es menos del 10% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(3) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad para caminar de forma independiente es inferior al 10% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(4) no se observa una reducción en la velocidad de correr/caminar 10 metros debido al envejecimiento en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(5) no se observa una reducción en la velocidad de subir 4 escalones debido al envejecimiento en el momento de la

semana 85 después del inicio del tratamiento; y

(6) no se observa una reducción en la velocidad de aumento debido al envejecimiento en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento.

<19>

La composición farmacéutica de acuerdo con el anterior <1>, donde cuando el tratamiento se realiza en pacientes humanos de 10 a 12 años con distrofia muscular de Duchenne durante 84 semanas, al menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en los siguientes efectos (1) a (6) se proporciona:

(1) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de aumento es menos del 60% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(2) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de subir 4 escalones es inferior al 50% en el momento de la 85ª semana después del inicio del tratamiento;

(3) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de caminar de forma independiente es inferior al 50% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(4) no se observa una reducción en la velocidad de correr/caminar 10 metros debido al envejecimiento en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(5) se observa un período en el que aumenta la velocidad

de subir 4 escaleras en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento; y

(6) se observa un período en el que aumenta la velocidad de subida en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento.

<20>

Un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne, que comprende la administración intravenosa de una composición farmacéutica que comprende un oligómero antisentido que consta de una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consta de nucleótidos en las posiciones 36 a 56 de la terminal 5’ del exón 53 de un gen de distrofina humana, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, a un paciente humano una vez a la semana a una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive del oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo.

<20-1>

El método de tratamiento de acuerdo con los 20 anteriores, en el que al menos uno de los efectos de acuerdo con la reivindicación 17, al menos uno de los efectos de acuerdo con la reivindicación 18, o al menos uno de los efectos de acuerdo con la reivindicación 19, es proporcionado

por el tratamiento. método.

<21>

Un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consiste en nucleótidos en las posiciones 36 a 56 de la terminal 5’ del exón 53 de un gen de distrofina humana, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, para uso en un método para tratar a un paciente humano con distrofia muscular de Duchenne, en el que

el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo se administra por vía intravenosa al paciente humano una vez a la semana a una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive.

<21-1>

El oligómero antisentido según los 21 anteriores, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, en el que al menos uno de los efectos según la reivindicación 17, al menos uno de los efectos según la reivindicación 18, o al menos uno de los efectos según la reivindicación 19 se proporciona mediante la administración del oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo.

<22>

Uso de un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consiste en nucleótidos en las posiciones 36 a 56 de la terminal 5’ del exón 53 de un gen de distrofina humana, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente humano con distrofia muscular de Duchenne, en la que

el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo se administra por vía intravenosa al paciente humano una vez a la semana a una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive.

[0012] Además, como otro aspecto, la presente invención es como sigue, pero no se limita a ella.

[1] Un método para tratar a un sujeto con distrofia muscular de Duchenne susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, en el que el método comprende una etapa de administración intravenosa de NS-065/NCNP-01 al sujeto a una dosis de aproximadamente 40 mg/kg/semana.

[2] Un método para tratar a un sujeto con distrofia muscular de Duchenne susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, en el que el método comprende

una etapa de administración intravenosa de NS-065/NCNP-01 al sujeto a una dosis de aproximadamente 80 mg/kg/semana.

[3] Un método para tratar a un sujeto con distrofia muscular de Duchenne susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, en el que el método comprende una etapa de administración intravenosa de NS-065/NCNP-01 al sujeto a una dosis de 40 mg/kg/semana o más y 80 mg/kg/semana o menos.

[4] El método según el [1] anterior, en el que lo que se administra es una solución acuosa que comprende:

NS-065/NCNP-01 en una concentración de 2.5 mg/mL o más y 500 mg/mL o menos; y

cloruro de sodio como agente tónico en una concentración de 8.55 mg/mL o más y 9.45 mg/mL o menos, y

en el que la solución acuosa tiene un valor de pH de aproximadamente 7.3.

[5] El método según el anterior [2], en el que lo que se administra es una solución acuosa que comprende:

NS-065/NCNP-01 en una concentración de 2.5 mg/mL o más y 500 mg/mL o menos; y

cloruro de sodio como agente de tonicidad en una concentración de 8.55 mg/mL o más y 9.45 mg/mL o menos, y

en el que la solución acuosa tiene un valor de pH de aproximadamente 7.3.

[6] El método según el anterior [3], en el que lo que se administra es una solución acuosa que comprende:

NS-065/NCNP-01 en una concentración de 2.5 mg/mL o más y 500 mg/mL o menos; y

cloruro de sodio como agente de tonicidad en una concentración de 8.55 mg/mL o más y 9.45 mg/mL o menos, y

en el que la solución acuosa tiene un valor de pH de aproximadamente 7.3.

[7] Un método para inducir la generación de una proteína distrofina en un sujeto con distrofia muscular de Duchenne susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, en el que el método comprende un paso de administración intravenosa de NS-065/NCNP-01 al sujeto en una dosis de aproximadamente 40 mg/kg/semana.

[8] Un método para inducir la generación de una proteína distrofina en un sujeto con distrofia muscular de Duchenne susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, en el que el método comprende un paso de administración intravenosa de NS-065/NCNP-01 al sujeto en una dosis de aproximadamente 80 mg/kg/semana.

[9] Un método para inducir la generación de una proteína distrofina en un sujeto con distrofia muscular de Duchenne susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, en el que el método comprende un paso de administración

intravenosa de NS-065/NCNP-01 al sujeto en una dosis de 40 mg/kg/semana o más y 80 mg/kg/semana o menos.

[10] El método según el anterior [7], en el que lo que se administra es una solución acuosa que comprende:

NS-065/NCNP-01 en una concentración de 2.5 mg/mL o más y 500 mg/mL o menos; y

cloruro de sodio como agente de tonicidad en una concentración de 8.55 mg/mL o más y 9.45 mg/mL o menos, y

en el que la solución acuosa tiene un valor de pH de aproximadamente 7.3.

[11] El método según el anterior [8], donde lo que se administra es una solución acuosa que comprende:

NS-065/NCNP-01 en una concentración de 2.5 mg/mL o más y 500 mg/mL o menos; y

cloruro de sodio como agente de tonicidad en una concentración de 8.55 mg/mL o más y 9.45 mg/mL o menos, y

en el que la solución acuosa tiene un valor de pH de aproximadamente 7.3.

[12] El método según el anterior [9], en el que lo que se administra es una solución acuosa que comprende:

NS-065/NCNP-01 en una concentración de 2.5 mg/mL o más y 500 mg/mL o menos; y

cloruro de sodio como agente de tonicidad en una concentración de 8.55 mg/mL o más y 9.45 mg/mL o menos, y

en el que la solución acuosa tiene un valor de pH de aproximadamente 7.3.

En los anteriores [1] a [12], NS-065/NCNP-01 (que también se denomina "Viltolarsen" en la presente descripción) también puede ser un equivalente del mismo. Además, en los anteriores [1] a [12], el sujeto también puede ser un paciente humano.

[0013] Según la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, que tiene una composición estable de Viltolarsen. Además, con respecto a la composición farmacéutica que comprende Viltolarsen, se proporcionan dosificación y método de administración de Viltolarsen, que exhiben efectos terapéuticos efectivos sobre la distrofia muscular de Duchenne y están en un rango seguro para pacientes humanos. Usando la composición farmacéutica, los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne se pueden reducir de manera efectiva con efectos secundarios bajos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0014] Figura 1 Muestra un diseño del estudio de búsqueda de dosis de fase 2 de EE. UU. NS-065/NCNP-01-201.

Figura 2 Muestra los resultados de la

	medición del nivel de expresión de novo de una proteína distrofina en el músculo esquelético según un método de transferencia Western.
Figura 3	Muestra un diseño del estudio de búsqueda de dosis de fase 2 de EE. UU./Canadá NS-065/NCNP-01-201.
Figura 4	Muestra comparaciones con respecto a los cambios desde la línea de base en los resultados de las pruebas de función cronometradas realizadas durante 24 semanas. En los cinco gráficos, el término "Viltolarsen" significa el nombre común internacional (DCI) de NS-065/NCNP-01.
Figura 5	Muestra los resultados de la evaluación de la estabilidad de Viltolarsen en un tampón

	Britton-Robinson (pH 3 a 11).
Figura 6	Muestra los resultados de la evaluación de la estabilidad de Viltolarsen en un tampón de fosfato de potasio-bórax (pH 6 a 9).
Figura 7	Muestra los resultados del examen de los ajustadores de pH a 121°C.
Figura 8	Incluye gráficos que muestran cambios desde la línea de base en los resultados de las pruebas de función motora individual.
Figura 9	Es un gráfico que muestra los resultados de una prueba de caminata de 6 minutos realizada en pacientes individuales evaluados de los grupos a los que se administró Viltolarsen (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis de 80 mg/kg) en el momento de la semana 85

	después de 84 semanas desde la administración inicial).
Figura 10	Es un gráfico que muestra las puntuaciones de una Evaluación Ambulatoria North Star realizada en pacientes individuales evaluados de los grupos administrados con Viltolarsen (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis de 80 mg/kg) en el momento de la semana 85 (después de 84 semanas desde la administración inicial).
Figura 11	Es un gráfico que muestra los resultados de la velocidad de una prueba de tiempo de reposo realizada en pacientes individuales evaluados de los grupos administrados con Viltolarsen (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis de 80 mg/kg) en el momento de la semana 85 (después de 84

	semanas desde la administración inicial).
Figura 12	Es un gráfico que muestra los resultados de la velocidad de una prueba de tiempo para subir 4 escaleras realizada en pacientes individuales evaluados de grupos administrados de Viltolarsen (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis de 80 mg/kg) en ese momento de la semana 85 (después de 84 semanas desde la administración inicial).
Figura 13	Es un gráfico que muestra los resultados de la velocidad de una prueba de tiempo para correr/caminar 10 metros realizada en pacientes individuales evaluados de los grupos administrados de Viltolarsen (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis

	de 80 mg/kg) a el momento de la semana 85 (después de 84 semanas desde la administración inicial).
Figura 14	Es un gráfico que muestra una correlación entre un cambio en el nivel de expresión de distrofina desde la línea de base de un valor de distrofina cuantitativo medido por WB y un cambio en la velocidad de una prueba de tiempo para resistir desde la línea de base, en pacientes individuales evaluados de Viltolarsen grupos administrados (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis de 80 mg/kg) en el momento de la semana 49 (después de 48 semanas desde la administración inicial).
Figura 15	Es un gráfico que muestra una correlación entre un cambio

en el nivel de expresión de distrofina desde la línea base de un valor cuantitativo de distrofina medido por WB y un cambio en la velocidad de una prueba de tiempo para subir 4 escaleras desde la línea base, en pacientes individuales evaluados de los grupos administrados con Viltolarsen (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis de 80 mg/kg) en el momento de la semana 49 (después de 48 semanas desde la administración inicial).

Figura 16 Es un gráfico que muestra una correlación entre un cambio en el nivel de expresión de distrofina desde la línea base de un valor cuantitativo de distrofina medido por WB y un cambio en la velocidad de una prueba de tiempo para

correr/caminar 10 metros desde el basal, en pacientes individuales evaluados de los grupos a los que se administró Viltolarsen (grupo de dosis de 40 mg/kg y grupo de dosis de 80 mg/kg) en el momento de la semana 49 (después de 48 semanas desde la administración inicial.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0015] A continuación, se describirá en detalle la presente invención. Las siguientes realizaciones se proporcionan como ejemplos para explicar la presente invención y, por lo tanto, no pretenden limitar la presente invención solo a estas realizaciones. La presente invención puede llevarse a cabo en varias realizaciones, sin apartarse del espíritu de la invención.

Todas las publicaciones y publicaciones de patentes tales como publicaciones de patentes abiertas o solicitudes de patentes citadas en la presente descripción se incorporan aquí como referencia en su totalidad. Además, la presente descripción incluye el contenido descrito en las especificaciones y dibujos de la solicitud de patente

provisional de EE. UU. (US62/690,270) presentada el 26 de junio de 2018 y la solicitud de patente provisional de EE. UU. (US62/739,386) presentada el 1 de octubre de 2018, para ambos de los cuales la presente solicitud reclama prioridad.

[0016] **I. Primera Realización**

En una Primera Realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica para tratar la distrofia muscular de Duchenne. Específicamente, la composición farmacéutica de la presente invención es una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente humano con distrofia muscular de Duchenne, la composición farmacéutica que comprende un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consiste en nucleótidos en las posiciones 36 a 56 de la 5’ -terminal del exón 53 de un gen de distrofina humana (en lo sucesivo también denominado "el oligómero de la presente invención"), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, en el que

el tratamiento comprende la administración intravenosa al paciente humano del oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo en una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive.

[0017] **53vo Exón Del Gen De La Distrofina Humana**

En la presente invención, el término "gen" incluye ADNc, un precursor de ARNm y ARNm, así como un gen genómico. El gen es preferiblemente un precursor de ARNm, es decir, pre-ARNm.

En el genoma humano, un gen de distrofina humana está presente en el locus del gen Xp21.2. El gen de la distrofina humana tiene un tamaño de 3.0 Mbp y es el gen más grande entre los genes humanos conocidos. Sin embargo, el tamaño de la región codificante del gen de la distrofina humana es de solo 14 kb, y la región codificante se dispersa como 79 exones en el gen de la distrofina (Roberts, RG., Et al., Genomics, 16: 536-538 (1993)). El pre-ARNm como producto transcripcional del gen de la distrofina humana genera ARNm maduro de 14 kb como resultado del corte y empalme. Se conoce la secuencia de bases del ARNm maduro de un gen de distrofina humana de tipo salvaje (No. De Acceso De GenBank NM_004006).

La secuencia de bases del exón 53 del gen de la distrofina humana de tipo salvaje es la que se expone en la SEQ ID NO: 1.

[0018] La composición farmacéutica de la presente invención comprende un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consiste en nucleótidos en las posiciones 36 a 56 de la terminal 5’ del exón 53 de un gen de distrofina humana (el

oligómero de la presente invención), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo.

En este documento, el oligómero de la presente invención se produce con el propósito de modificar una proteína codificada por un gen de distrofina de tipo DMD a una proteína de distrofina de tipo BMD omitiendo el exón 53. Por consiguiente, el exón 53 de un gen de distrofina como diana de la omisión de exón con el oligómero de la presente invención incluye no sólo el exón 53 de tipo salvaje sino también el exón 53 de tipo mutante.

[0019] Un ejemplo específico de tal exón 53 de tipo mutante de un gen de distrofina humana puede ser un polinucleótido que tiene una identidad de 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, o 99.9% o más, con respecto a la secuencia de bases como se establece en SEQ ID NO: 1. En la presente descripción, el término "polinucleótido" significa ADN o ARN.

[0020] Además, la identidad de las secuencias de bases se puede determinar utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de Carlin y Arthur (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90:

5873, 1993). Basándose en el algoritmo de BLAST, se han desarrollado programas denominados BLASTN o BLASTX (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990). Cuando se analiza una secuencia base usando BLASTN, los parámetros se establecen para ser, por ejemplo, puntuación = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se usan los parámetros predeterminados de los programas individuales.

[0021] En la presente descripción, la "secuencia de bases complementaria" no se limita a una secuencia de bases que forma un par de bases de Watson-Crick con la secuencia de bases diana, sino que también incluye una secuencia de bases que forma un par de bases oscilantes. En este documento, el término "par de bases de Watson-Crick" significa un par de bases en el que se forman enlaces de hidrógeno entre adenina-timina, adenina-uracilo y guanina-citosina, mientras que el término "par de bases oscilantes" significa un par de bases en el que se forman enlaces de hidrógeno entre guanina-uracilo, inosina-uracilo, inosina-adenina e inosina-citosina. Además, la "secuencia de bases complementarias" puede no tener una complementariedad del 100% con la secuencia de bases diana y, por ejemplo, la secuencia de bases complementaria puede comprender 1, 2, 3, 4 o 5 bases no complementarias con respecto a la diana. secuencia de bases.

Además, la secuencia de bases complementaria también puede ser una secuencia de bases que sea más corta que la secuencia de bases diana en 1, 2, 3, 4 o 5 bases.

[0022] En la siguiente tabla se muestran ejemplos de la secuencia que consta de nucleótidos en las posiciones 36 a 56 de la terminal 5’ del exón 53 (SEQ ID NO: 2) y una secuencia de bases complementaria a la secuencia antes mencionada (SEQ ID NO: 3) 1.

[0023] **Tabla 1**

5'-GAACACCTTCAGAACCGGAGG-3'	SEQ ID NO: 2
5'-CCTCCGGTTCTGAAGGTGTTC-3'	SEQ ID NO: 3

[0024] En este caso, la timina "T" y el uracilo "U" pueden intercambiarse mutuamente. Incluso si la base es "T" o "U", no afecta sustancialmente a la actividad de omisión de exón del oligómero de la presente invención. Por consiguiente, en la presente solicitud, incluso si la "T" en la secuencia de bases que tiene un cierto número de secuencia es "U", se muestra con el mismo número de secuencia. Por tanto, la secuencia descrita en la presente solicitud incluye inevitablemente tanto una secuencia "T" como una secuencia "U".

[0025] En vista de lo anterior, la secuencia de bases del oligómero de la presente invención puede consistir en la secuencia establecida en SEQ ID NO: 3. Además, el oligómero

de la presente invención puede no tener una secuencia de bases que sea 100% complementaria. a la secuencia diana, siempre que permita la omisión del exón 53 de un gen de la distrofina humana. Por ejemplo, el oligómero de la presente invención puede comprender 1, 2, 3, 4 o 5 bases no complementarias con respecto a la SEQ ID NO: 2 como secuencia diana. De lo contrario, el oligómero de la presente invención puede ser una secuencia de bases que sea más corta que la secuencia de bases diana en 1, 2, 3, 4 o 5 bases.

[0026] Se puede confirmar si se ha producido o no la omisión del exón 53 de un gen de la distrofina humana: introduciendo el oligómero de la presente invención en células que expresan distrofina (por ejemplo, células de rabdomiosarcoma humano), amplificando una región periférica del exón 53 del ARNm de un gen de distrofina humana, a partir del ARN total de las células que expresan distrofina descritas anteriormente, mediante RT-PCR; y luego realizar PCR anidada o análisis de secuencia en el producto amplificado por PCR. Alternativamente, si se ha producido tal omisión o no, también se puede confirmar midiendo la cantidad de exón 53 mediante un método como RT-PCR, Western Blot o espectrometría de masas en una muestra derivada de un paciente al que el oligómero de la presente invención ha sido administrado.

La eficiencia de omisión se puede obtener recuperando el ARNm de un gen de distrofina humana de las células de prueba, luego midiendo la cantidad de polinucleótidos "A" de una banda que involucra la omisión del exón 53 y la cantidad de polinucleótidos "B" de una banda que no involucra la omisión del exón 53 en el ARNm, y luego calcular la eficiencia de salto de acuerdo con la siguiente ecuación basada en los valores de medición "A" y "B".

Omisión de eficiencia (%) = A/(A + B) x 100

[0027] El oligómero de la presente invención puede incluir un oligonucleótido, un oligómero morfolino y un oligómero de ácido nucleico peptídico (PNA). El oligómero de la presente invención es preferiblemente un oligómero morfolino.

[0028] El oligonucleótido descrito anteriormente (en lo sucesivo denominado "el oligonucleótido de la presente invención") es un oligómero de la presente invención que comprende un nucleótido como unidad constitucional, y dicho nucleótido puede ser cualquiera de un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido o un nucleótido.

El nucleótido modificado significa un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido, en el que la totalidad o una parte de las bases de ácido nucleico, porciones de azúcar y

porciones de enlace fosfato que constituyen el ribonucleótido o el desoxirribonucleótido están modificadas.

[0029] [Los ejemplos de la base de ácido nucleico pueden incluir adenina, guanina, hipoxantina, citosina, timina, uracilo y un nucleótido modificado de los mismos. Un ejemplo de tal nucleótido modificado puede incluir, pero no limitado a, pseudouracilo, 3-metiluracilo, dihidrouracilo, 5-alquilcitosina (por ejemplo, 5-metilcitosina), 5-alquiluracilo (por ejemplo, 5-etiluracilo), 5-halouracilo (5-bromouracilo), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidina (6-metiluracilo), 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouratilaminometilcarboxilo, 1-metiladenina, 1-metilhipoxantina, 2,2-dimetilguanina, 3-metilcitosina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5-metilaminometiluracilo, 5-metilcarbonilometiloxiuracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, 2-tiocitosina, purina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, isoguanina, indol, imidazol y xantina.

[0030] Los ejemplos de modificación de una porción de azúcar pueden incluir la modificación de la posición 2' de la ribosa y la modificación de otras posiciones de una porción

de azúcar. La modificación de la posición 2' de la ribosa puede ser, por ejemplo, la modificación de la sustitución del grupo -OH en la posición 2' de la ribosa con OR, R, R', OR, SH, SR, NH_2, NHR, NR_2, N_3, CN, F, Cl, Br, o I. En la presente, R indica alquilo o arilo. R' indica alquileno.

Los ejemplos de modificación de otras posiciones de una porción de azúcar pueden incluir, entre otros, la sustitución de O en la posición 4' de ribosa o desoxirribosa por S, y la reticulación entre la posición 2' y la posición 4' de una porción de azúcar, como LNA (Ácido nucleico bloqueado) o ENA (ácidos nucleicos con puentes de etileno 2'-O, 4'-C).

[0031] Ejemplos de modificación de una porción de enlace fosfato puede ser la modificación de la sustitución de un enlace fosfodiéster con un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato o un enlace boranofosfato (Enya et al.: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (ver, por ejemplo, la Reedición de las Publicaciones Internacionales PCT Nos. 2006/129594 y 2006/038608).

[0032] Como alquilo, es preferible un alquilo lineal o ramificado que contenga de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos específicos de tal alquilo pueden incluir 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 sustituido. Los ejemplos de tal sustituyente pueden incluir halógeno, alcoxi, ciano y nitro. El alquilo puede estar sustituido con 1 a 3 de estos sustituyentes.

[0033] Como cicloalquilo, es preferible un cicloalquilo que contenga de 5 a 12 átomos de carbono. Los ejemplos específicos de dicho cicloalquilo pueden incluir ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo y ciclododecilo.

[0034] Los ejemplos de halógeno pueden incluir flúor, cloro, bromo y yodo.

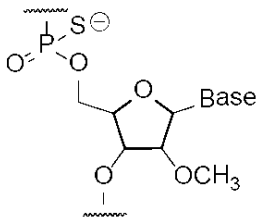
[0035] Los ejemplos de un alcoxi pueden incluir un alcoxi lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, como metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentiloxi, isopentiloxi, n-hexiloxi e isohexiloxi. Entre otros, es preferible un alcoxi que contenga de 1 a 3 átomos de carbono.

[0036] Como arilo, es preferible un arilo que contenga de 6 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos específicos de tal arilo pueden incluir fenilo, α-naftilo y β-naftilo. Entre otros, es preferible el fenilo. El arilo puede estar sustituido. Los ejemplos de tal sustituyente pueden incluir alquilo, halógeno, alcoxi, ciano y nitro. El arilo puede estar sustituido con 1 a 3 de estos sustituyentes.

[0037] Como alquileno, es preferible un alquileno lineal o ramificado que contenga de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos específicos de tal alquileno pueden incluir metileno, etileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno y 2-(etil)trimetileno, 1-(metil) tetrametileno.

[0038] Los ejemplos de un acilo pueden incluir un alcanoílo y un aroílo lineales o ramificados. Los ejemplos del alcanoílo pueden incluir formilo, acetilo, 2-metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoílo, 2,2-dimetilpropionilo y hexanoílo. Los ejemplos del aroílo pueden incluir benzoílo, toluoílo y naftoílo. Dicho aroílo puede estar sustituido en una posición reemplazable y puede estar sustituido con un alquilo.

[0039] En un aspecto en el que el oligómero de la presente invención es un oligonucleótido, el oligonucleótido puede comprender preferiblemente, como unidad constitucional, un grupo representado por la siguiente fórmula general, en la que el grupo -OH en la posición 2' de la ribosa está sustituido con un metoxi y la porción de enlace fosfato es un enlace fosforotioato:

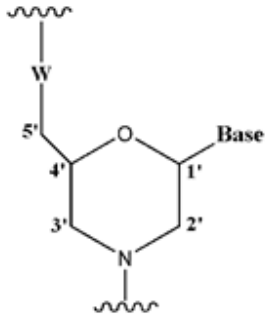


Fórmula 1

en donde Base indica una base de ácido nucleico.

[0040] Dicho oligonucleótido se puede sintetizar fácilmente usando varios tipos de sintetizadores automáticos (por ejemplo, AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)). De lo contrario, el oligonucleótido también se puede producir subcontratando la síntesis del mismo a una organización de terceros (por ejemplo, Promega o Takara), etc.

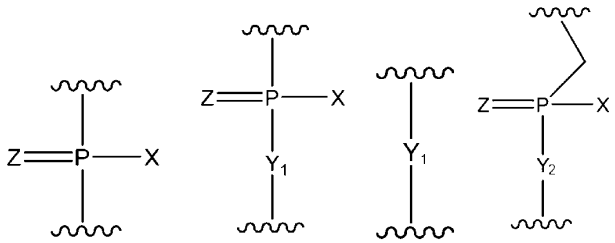
[0041] Cuando el oligómero de la presente invención es un oligómero morfolino, el oligómero morfolino puede comprender, como unidad constitucional, un grupo representado por la siguiente fórmula general:



Fórmula 2

en donde Base es como se definió anteriormente; y

W representa un grupo representado por cualquiera de las siguientes fórmulas:



Fórmula 3

en donde X representa $-CH_2R^1$, $-O-CH_2R^1$, $-S-CH_2R^1$, $-NR^2R^3$, o F;

R^1 representa H o alquilo;

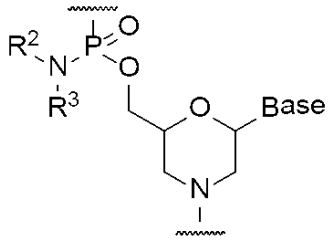
R^2 y R^3, las cuales son iguales o diferentes, cada una representa H, alquilo, cicloalquilo, o arilo;

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

Y_2 representa O, S, o NR^1; y

Z representa O o S.

[0042] El oligómero morfolino es preferiblemente un oligómero que comprende, como unidad constitucional, un grupo representado por la siguiente fórmula (es decir, un oligómero morfolino fosforodiamidato (en lo sucesivo denominado "PMO")):

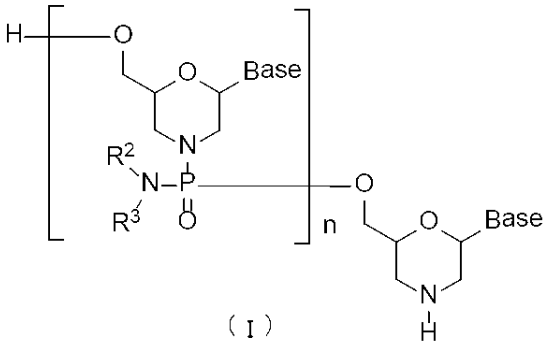


Fórmula 4

en donde Base, R^2 y R^3 son como se describieron anteriormente.

[0043] El oligómero morfolino se puede producir, por ejemplo, de acuerdo con la Publicación Internacional No. WO 1991/009033 o la Publicación Internacional No. WO 2009/064471. En particular, se puede producir PMO de acuerdo con el método descrito en la Publicación Internacional No. WO 2009/064471, o de acuerdo con el método descrito a continuación.

[0044] En un aspecto, PMO puede incluir, por ejemplo, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) (en lo sucesivo denominado "PMO (I)"):



(I)

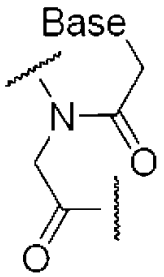
Fórmula 5

donde cada Base, R^2 y R^3 son como se definieron anteriormente; y

n representa cualquier número entero dado en el rango de 1 a 99, y preferiblemente representa cualquier número entero dado en el rango de 18 a 28.

[0045] La PMO (I) se puede producir de acuerdo con un método conocido, y los compuestos y reactivos utilizados en la producción de PMO (I) no están particularmente limitados, siempre que se utilicen comúnmente en la producción de PMO. Además, la producción puede realizarse mediante un método en fase líquida o un método en fase sólida (en el que se utilizan sintetizadores automáticos de fase sólida manuales o disponibles comercialmente). Cuando la PMO se produce mediante un método de fase sólida, es deseable un método de uso de un sintetizador automático desde el punto de vista de la simplificación de los procedimientos operativos y la precisión en la síntesis.

[0046] El ácido nucleico peptídico es un oligómero de la presente invención que comprende, como unidad constitucional, un grupo representado por la siguiente fórmula general:



Fórmula 6

en donde Base es como se describió anteriormente.

[0047] El ácido nucleico peptídico se puede producir, por ejemplo, según las siguientes publicaciones:

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

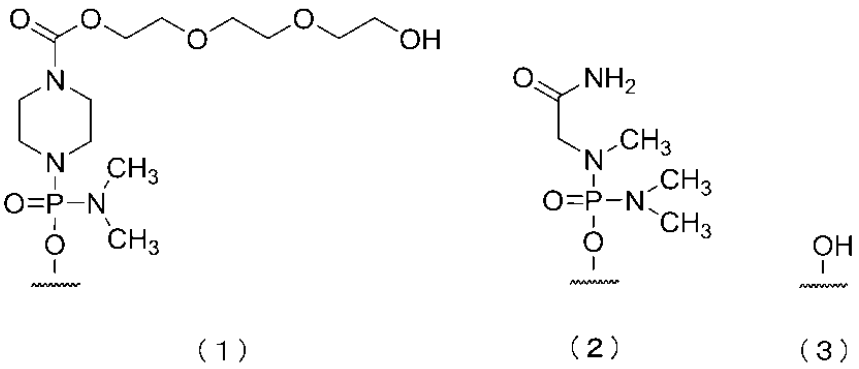
2) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen, R. H. Berg, Jacs., 114, 1895 (1992)

3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem. 59, 5767 (1994)

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)

[0048] Además, la terminal 5′ del oligómero de la presente invención puede ser un grupo representado por cualquiera de las siguientes fórmulas químicas (1) a (3). Preferiblemente es -OH mostrado en (3).



Fórmula 7

De ahora en adelante, los grupos representados por las fórmulas (1), (2) y (3) anteriores se denominan "grupo (1)", "grupo (2)" y "grupo (3)", respectivamente.

[0049] Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable del oligómero de la presente invención pueden incluir: sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de litio; sales de metales alcalinotérreos, como sales de calcio o sales de magnesio; sales de metales, tales como sales de aluminio, sales de hierro, sales de zinc, sales de cobre, sales de níquel o sales de cobalto; sales de amonio; sales de amina orgánica, tales como sales de t-octilamina, sales de dibencilamina, sales de morfolina, sales de glucosamina, sales de éster de alquilo de fenilglicina, sales de etilendiamina, sales de N-metilglucamina, sales de guanidina, sales de dietilamina, sales de trietilamina, sales de diciclohexilamina, sales de N, N'-dibenciletilendiamina, sales de cloroprocaína, sales de procaína, sales de dietanolamina, sales de N-bencil-fenetilamina, sales de piperazina, sales de tetrametilamonio o sales de tris(hidroximetil)aminometamina; sales de ácido hidrohalogénico, tales como hidrofluoruro, hidrocloruro, hidrobromuro o hidroyoduro; sales de ácidos inorgánicos, tales como nitrato, perclorato, sulfato o fosfato; alcanosulfonatos inferiores, tales como metanosulfonato,

trifluorometanosulfonato o etanosulfonato; arilsulfonatos tales como bencenosulfonato o p-toluensulfonato; sales de ácidos orgánicos, tales como acetato, malato, fumarato, succinato, citrato, tartrato, oxalato o maleato; y sales de aminoácidos, tales como sales de glicina, sales de lisina, sales de arginina, sales de ornitina, glutamato o aspartato. Estas sales se pueden producir según un método conocido. De lo contrario, el oligómero de la presente invención puede estar en forma de un hidrato del mismo.

[0050] En otro aspecto, el oligómero de la presente invención puede ser Viltolarsen o un equivalente del mismo.

Viltolarsen es el nombre común internacional (DCI) de NS-065/NCNP-01. En la presente descripción, NS-065/NCNP-01 también se denomina NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) o Viltolarsen, así como NS-065/NCNP-01.

[0051] NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) es un fármaco oligonucleotídico antisentido para el tratamiento de pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD) susceptibles de un tratamiento que implica la omisión del exón 53. NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) es un compuesto descrito como "PMO No. 8" en la Patente de Estados Unidos No. 9,079,934 B2. La secuencia de bases de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) es como se establece en SEQ ID NO: 35 (5'-CCTCCGGTTC TGAAGGTGTTC-3'; SEQ ID NO: 3 en la presente

descripción), y el 5'-terminal por lo tanto es -OH. El contenido de la Patente de Estados Unidos No. 9,079,934 B2 se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. Además, la Patente de Estados Unidos No. 9,079,934 B2 describe un método para sintetizar PMO No. 8, a saber, NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen).

[0052] NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) tiene un esqueleto morfolino que se prevé que proporcione mayor seguridad que el oligonucleótido de fosforotioato. Por ejemplo, el desarrollo de un oligonucleótido de fosforotioato, drisapersen (de BioMarin), se ha suspendido debido a problemas de seguridad. Por otro lado, la FDA aprobó un oligonucleótido morfolino, eteplirsen (Exondys51® de Sarepta). Tanto drisapersen como eteplirsen son para pacientes con DMD susceptibles de un tratamiento que implica la omisión del exón 51. El Eteplirsen se describe en la Patente de EE.UU. No. 9,506,058 B2, y su contenido se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

[0053] Como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 9,079,934 B2, NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) ha sido diseñado para exhibir una actividad específica de omisión del exón 53 con el fin de producir una proteína distrofina funcional en pacientes con DMD con deficiencias específicas de exones, incluidos los exones 43-52, 45-52, 47-52, 48-52,

49-52, 50-52 o 52. En la Tabla 3 de Aartsma-Rus et al., se dan ejemplos de mutaciones que causan DMD teóricamente curables omitiendo un exón específico, 2002. El contenido de la publicación de Aartsma-Rus et al. se incorpora como referencia en su totalidad (Annemieke Aartsma-Rus, Mattie Bremmer-Bout, Anneke AM Janson, Johan T. den Dunnen, Gert-Jan B. van Ommen y Judith CT van Deutekom, “Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy”, "Neuromuscular Disorders, Vol. 12, pp. S71–S77 (2002)).

[0054] El "equivalente" de Viltolarsen es un compuesto que es un fármaco genérico de Viltolarsen o un ingrediente activo del mismo. Dichos equivalentes han obtenido la aprobación de fabricación y venta de acuerdo con la Ley de Asuntos Farmacéuticos, basada en la seguridad y eficacia confirmada por los ensayos clínicos de Viltolarsen, sin someterse a los ensayos clínicos de los propios equivalentes, y se espera que los equivalentes tengan una actividad de omisión del exón 53 similar al de Viltolarsen. En cierto aspecto, el "equivalente" de Viltolarsen tiene la misma secuencia de bases que el de Viltolarsen, y el "equivalente" de Viltolarsen incluye equivalentes, en los que la totalidad o parte de las bases de ácido nucleico, porciones de azúcar y enlace fosfato porciones del equivalente se modifican de la

misma manera que las de Viltolarsen, o se modifican de manera diferente a Viltolarsen. El aspecto de tal modificación es el mismo que el del aspecto descrito anteriormente. Además, el "equivalente" de Viltolarsen puede estar en forma de cuerpo libre, una sal farmacéuticamente aceptable o un hidrato.

[0055] **2. Composición Del Producto Farmacéutico**

La composición farmacéutica de la presente invención también puede estar en forma de solución acuosa. La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender el oligómero de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, en una concentración de 2.5 a 500 mg/ml, 5 a 450 mg/ml, 10 a 400 mg/ml, 15 a 350 mg/ml, 20 a 300 mg/ml, 20 a 250 mg/ml, 20 a 200 mg/ml, 20 a 150 mg/ml, 20 a 100 mg/ml, 20 a 50 mg/ml, 20 a 40 mg/ml, 20 a 30 mg/ml, 23 a 27 mg/ml, 24 a 26 mg/ml o 25 mg/ml. De lo contrario, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender el oligómero de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, en una concentración de 10 a 100 mg/ml, 15 a 95 mg/ml, 20 a 80 mg/ml, 25 a 75 mg/ml, 30 a 70 mg/ml, 35 a 65 mg/ml, 40 a 60 mg/ml, 45 a 55 mg/ml, 47 a 53 mg/ml, 48 a 52 mg/ml, 49 a 51 mg/ml o 50 mg/ml.

[0056] En la composición farmacéutica de la presente invención, se puede cambiar la concentración de Viltolarsen en la solución acuosa. Para preparar una solución acuosa de Viltolarsen, por ejemplo, se pueden mezclar 250 mg de Viltolarsen en 0.5 mL a 100 mL de agua (correspondiente a una concentración de Viltolarsen de 2.5 mg/mL a 500 mg/mL), más preferiblemente 1 mL a 50 mL de agua (correspondiente a una concentración de Viltolarsen de 5 mg/mL a 250 mg/mL), y más preferiblemente de 5 mL a 10 mL de agua (correspondiente a una concentración de Viltolarsen de 25 mg/mL a 50 mg/mL).

[0057] La forma de administración de la composición farmacéutica de la presente invención es la administración intravenosa. La posible forma de dosificación de la composición farmacéutica de la presente invención es, por ejemplo, una solución de inyección (que incluye un líquido de goteo).

[0058] La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además al menos un componente seleccionado entre un agente de tonicidad, un ajustador de pH y un disolvente.

[0059] El agente de tonicidad comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención puede ser al menos uno seleccionado de cloruro de sodio, cloruro de

potasio, glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa, lactosa, manitol, sorbitol, xilitol, trehalosa y glicerina.

[0060] 10 ml de una solución acuosa que comprende 250 mg de Viltolarsen adecuada para inyección pueden contener, como agente tónico, 72.0 mg o más y 108.0 mg o menos de cloruro de sodio (correspondiente a cloruro de sodio en una concentración de 7.2 mg/ml a 10,8 mg/mL), más preferiblemente 81.0 mg o más y 99.0 mg o menos de cloruro de sodio (correspondiente a cloruro de sodio en una concentración de 8.1 mg/mL a 9.9 mg/mL), y más preferiblemente 85.5 mg o más y 94.5 mg o menos de cloruro de sodio (correspondiente al cloruro de sodio en una concentración de 8.55 mg/mL a 9.45 mg/mL).

[0061] Como agente de tonicidad, se puede utilizar un tampón de fosfato. Los ejemplos de tal tampón de fosfato pueden incluir un tampón citrato, un tampón lactato y un tampón acetato. Además, como agente tónico, también se pueden usar azúcares (distintos de la glucosa). Los ejemplos de dicho azúcar pueden incluir sorbitol y manitol. Cuando se prepara una composición que contiene Viltolarsen, también se pueden usar una pluralidad de agentes de tonicidad.

[0062] El ajustador de pH comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención puede ser al menos uno seleccionado de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido

fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, trietanolamina, ácido cítrico, ácido láctico, fosfato (hidrogenofosfato de sodio, dihidrogenofosfato de sodio y dihidrogenofosfato de potasio) y monoetanolamina.

[0063] En el caso de usar un tampón de fosfato para el oligómero de la presente invención, por ejemplo, para Viltolarsen, la concentración del tampón de fosfato es preferiblemente menor que 100 mM. Por consiguiente, la concentración del tampón de fosfato en la composición farmacéutica de la presente invención puede ajustarse a 90 mM o menos, 80 mM o menos, 70 mM o menos, 60 mM o menos, 50 mM o menos, 40 mM o menos, 30 mM o menos, 20 mM o menos, 10 mM o menos, o 5 mM o menos, o la composición farmacéutica de la presente invención puede no comprender un tampón de fosfato.

[0064] El disolvente comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención puede ser agua.

[0065] El valor de pH de la solución acuosa que comprende Viltolarsen adecuada para inyección puede ser pH 6.0 o más y 8.5 o menos, más preferiblemente pH 6.5 o más y 8.0 o menos, y lo más preferiblemente 7.0 o más y 7.5 o menos.

El oligómero de la presente invención exhibe estabilidad en una amplia gama de valores de pH. El valor de pH de la composición farmacéutica de la presente invención se ajusta

preferiblemente a pH 7.0 a 7.5, 7.0 a 7.4, 7.1 a 7.5, 7.1 a 7.4, 7.2 a 7.5, 7.2 a 7.4, 7.3 a 7.5, 7.3 a 7.4, o 7.3.

[0066] Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de una solución acuosa que comprende el oligómero de la presente invención en una concentración de entre 2.5 mg/ml inclusive y 500 mg/ml inclusive, o entre 10 mg/ml inclusive, y 100 mg/ml inclusive, y cloruro de sodio en una concentración entre 8 mg/ml inclusive y 10 mg/ml inclusive, y que tiene un valor de pH de 7.2 a 7.4.

Alternativamente, la composición farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de una solución acuosa que comprende el oligómero de la presente invención en una concentración de 25 mg/ml y que tiene un valor de pH que se ajusta a pH 7,3, sin contener tampón. En esta composición farmacéutica, el valor de pH se ajusta utilizando ácido clorhídrico y/o hidróxido de sodio.

[0067] Como ejemplo de la composición farmacéutica de la presente invención, en la siguiente Tabla 2 se muestra una composición que contiene 250 mg de Viltolarsen para uso en inyección, que se usó en el programa clínico de fase 2 de EE.UU./Canadá. A continuación, se muestra la composición en la Tabla 2 se hace referencia como "Inyección de 250 mg de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen)".

[0068] **Tabla 2 "NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyección 250 mg"**

Composición de (250 mg en 10 mL, o equivalentemente, 25 mg/mL)

Componente (USP = Farmacopea de EE.UU.)	Función	Cantidad (por vial)
NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen)	Sustancia del fármaco	250 mg
Cloruro de sodio (Calidad USP)	Agente de tonicidad	90 mg
Ácido clorhídrico (Calidad USP)	Ajustador de pH	q.s.[1]
Hidróxido de sodio (Calidad USP)	Ajustador de pH	q.s.[1]
Agua para inyección (Calidad USP)	Medium	q.s.
	Cantidad total	10 mL

[1] Las "q.s." de ácido clorhídrico e hidróxido de sodio es una "cantidad suficiente" para ajustar el valor de pH a pH 7.3 y, al mismo tiempo, es una cantidad que no afecta sustancialmente a la isotonicidad de la composición.

[0069] Además, en la composición de "NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyectable 250 mg", las cantidades de agua para inyección y cloruro de sodio utilizados como agente de tonicidad pueden ajustarse cada una a aproximadamente la mitad de la cantidad, de modo que la cantidad total se establece en 5 ml. También se incluye en la presente invención una composición farmacéutica que comprende Viltolarsen con la composición antes mencionada en una concentración de 50 mg/ml.

[0070] El volumen de la solución acuosa que contiene Viltolarsen puede aumentarse o disminuirse, siempre que las concentraciones de NS-065/NCNP-01 y el agente de tonicidad usado, y la relación en peso entre Viltolarsen y el agente de tonicidad usado, se mantengan al mismo nivel. niveles como los descritos anteriormente.

[0071] La composición que comprende Viltolarsen también puede comprender un vehículo para promover el suministro de Viltolarsen a los tejidos musculares. Dicho vehículo no está particularmente limitado, siempre que sea un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de dicho vehículo pueden incluir vehículos catiónicos (por ejemplo, liposomas catiónicos y polímeros catiónicos) y vehículos que usan envoltura viral. Los ejemplos de liposomas catiónicos pueden incluir liposomas que comprenden, como componentes esenciales, 2-O-(2-dietilaminoetil)carbamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y fosfolípidos, tales como Oligofectamine® (fabricado por Thermo Fisher Scientific), Lipofectin® (fabricado por Thermo Fisher Scientific), Lipofectamine® (fabricado por Thermo Fisher Scientific), Lipofectamine® 2000 (fabricado por Thermo Fisher Scientific), DMRIE-C (fabricado por Thermo Fisher Scientific), GeneSilencer® (fabricado por Gene Therapy Systems), TransMessenger® (fabricado por QIAGEN) y TransIT-TKO®. Los ejemplos de polímeros catiónicos pueden

incluir JetSI® (fabricado por GeneX India Bioscience) y Jet-PEI® (polietilenimina, fabricado por GeneX India Bioscience). Un ejemplo de los portadores que usan envoltura viral puede ser GenomeOne® (liposoma HVJ-E, fabricado por ISHIHARA SANGYO KAISHA, LTD.).

[0072] Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede comprender un coadyuvante de emulsificación (por ejemplo, ácido graso que contiene de 6 a 22 átomos de carbono o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, albúmina y dextrano) y un estabilizador (por ejemplo, colesterol y ácido fosfatídico).

[0073] En la composición farmacéutica de la presente invención que comprende Viltolarsen y un portador, la relación en peso entre Viltolarsen y un portador (es decir, portador/Viltolarsen) puede cambiarse dependiendo del tipo de portador utilizado. La relación en peso está convenientemente en el rango de 0.1 a 100, preferiblemente en el rango de 1 a 50, y más preferiblemente en el rango de 10 a 20.

[0074] La solución acuosa que contiene Viltolarsen puede administrarse a pacientes mediante perfusión intravenosa por goteo o perfusión por goteo.

[0075] **3. Indicación/Efectos y Administración/Posología**

Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se usa en un tratamiento, el oligómero de la presente

invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, se administra por vía intravenosa a un paciente humano a una dosis de entre 40 mg/kg/semana. inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive (en lo sucesivo denominado "el método de dosificación y administración de la presente invención"). Alternativamente, el método de dosificación y administración de la presente invención puede ser como sigue: el oligómero de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, se administra por vía intravenosa a un paciente humano a una dosis de 40 mg/kg/semana. Alternativamente, el método de dosificación y administración de la presente invención puede ser como sigue: el oligómero de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, se administra por vía intravenosa a un paciente humano a una dosis de 80 mg/kg/semana. En la presente, el numerador "mg" en la unidad de dosificación "mg/kg" indica la cantidad del oligómero de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, que se indica con la unidad "miligramo", mientras que el denominador "kg" indica 1 kilogramo de peso corporal de un paciente humano.

[0076] La inyección de 250 mg de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) se ha desarrollado para su uso en infusión

intravenosa por goteo que se realiza una vez a la semana para el tratamiento de pacientes con DMD susceptibles de un tratamiento que implica la omisión del exón 53. El programa clínico de fase 2 de EE.UU./Canadá ha sido diseñado para evaluar Viltolarsen administrado en dos tipos de dosis, es decir, a una dosis de 40 mg/kg/semana y a una dosis de 80 mg/kg/semana. En este documento, kg es una unidad que indica el peso corporal de un paciente. Por ejemplo, cuando se administra Viltolarsen a una dosis de 40 mg/kg/semana a un paciente con un peso corporal de 40 kg, significa que se administran al paciente 1.600 mg (=40 mg x 40) de Viltolarsen una vez a la semana.

[0077] **4. Enfermedad**

La DMD es una enfermedad muscular causada por una mutación por pérdida de función de un gen de la distrofina, y esta enfermedad provoca la pérdida de una proteína distrofina en el músculo de los pacientes (Hoffman et al., 1987). El gen de la distrofina está presente en el cromosoma X y muestra una alta tasa de mutación espontánea. En todas las poblaciones investigadas en todo el mundo, la tasa de incidencia de DMD es de uno en 5,000 niños al nacer sobreviviente. Según la evaluación reciente, se demostró que el 10.1% de los 7.149 pacientes con DMD evaluados en la base de datos global de pacientes eran susceptibles de recibir un

tratamiento con omisión del exón 53 (Bladen et al., 2015). Los síntomas clínicos se presentan típicamente en la edad escolar temprana (entre los 4 y los 6 años de edad), cuando los niños afectados muestran dificultad para mantenerse físicamente a la par con sus compañeros debido a la debilidad de los músculos proximales (como dificultad para subir escaleras o correr). La dificultad para levantarse del suelo se observa en la mayoría de los pacientes en los que se usa la maniobra típica de Gower para lograr una posición de pie (es decir, usar apoyo para las manos en las piernas, las rodillas y los muslos para lograr una posición de pie). (Hoffman EP, Brown RH y Kunkel LM. (1987). Distrofina: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51, 919-928. y Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, Dawkins H, Lamont L, Roy AJ, Chamova T, Guergueltcheva V, Chan S, Korngut L, Campbell C, Dai Y, Wang J, Barišić N, Brabec P, Lahdetie J, Walter MC, Schreiber-Katz O, Karcagi V, Garami M, Viswanathan V, Bayat F, Buccella F, Kimura E, Koeks Z, van den Bergen JC, Rodrigues M, Roxburgh R, Lusakowska A, Kostera-Pruszczyk A, Zimowski J, Santos R, Neagu E, Artemieva S, Rasic VM, Vojinovic D, Posada M, Bloetzer C, Jeannet PY, Joncourt F, Díaz-Manera J, Gallardo E, Karaduman AA, Topaloğlu H, El Sherif R, Stringer A, Shatillo AV, Martin AS, Peay HL,

Bellgard MI, Kirschner J, Flanigan KM, Straub V, Bushby K, Verschuuren J, Aartsma-Rus A, Béroud C, Lochmüller H. (2015). The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. Hum Mutat. 36(4): 395-402).

[0078] Los tejidos musculares de los pacientes con DMD muestran inflamación crónica, con episodios de degeneración y regeneración muscular que conducen al desgaste muscular, la discapacidad y la muerte prematura. Los pacientes generalmente pierden la deambulación en la segunda década de la vida y requieren asistencia con muchos aspectos de la vida diaria en la tercera década. Esta enfermedad suele provocar la muerte en la adolescencia o en la adultez temprana, aunque el uso de dispositivos de asistencia respiratoria a veces puede prolongar la vida hasta la cuarta década y muy ocasionalmente la quinta década de la vida.

[0079] La mutación del gen DMD en un sujeto puede detectarse mediante el uso de amplificación de sonda dependiente de ligadura múltiple (MLPA) (Murugan et al., 2010). El contenido de este artículo de Murugan et al. se incorpora como referencia en su totalidad (Sakthivel Murugan SM, Arthi Chandramohan y Bremadesam Raman Lakshmi, “Use of multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) for Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene mutation analysis”,

Indian Journal of Medical Research, vol. 132, págs. 303-311 (septiembre de 2010)).

[0080] El paciente humano de interés del tratamiento que utiliza la composición farmacéutica de la presente invención (en lo sucesivo denominado "paciente de interés de la presente invención") no está particularmente limitado, siempre que se diagnostique que el paciente está afectado con DMD por un doctor en medicina. En cierto aspecto, el paciente puede tener una mutación que resulte en una deficiencia en cualquier exón seleccionado del grupo que consiste en los exones 43-52, 45-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52 o 52, en un gen de la distrofina.

[0081] Además, el paciente de interés de la presente invención se puede caracterizar porque la expresión de una proteína distrofina antes del tratamiento usando la composición farmacéutica de la presente invención o el oligómero de la presente invención es del 1% o menos en comparación con la de un sujeto sano (100%), medido por Western Blot o espectrometría de masas. En este documento, el "sujeto sano" es un ser humano que no tiene una enfermedad asociada con una proteína distrofina. El nivel de expresión de una proteína distrofina en un sujeto sano puede ser un valor generalmente conocido o un valor obtenido de un sujeto sano individual. Además, el paciente de interés de la

presente invención también puede caracterizarse porque la expresión de una proteína distrofina no se ve antes del tratamiento usando la composición farmacéutica de la presente invención o el oligómero de la presente invención. La frase "no se ve la expresión de una proteína distrofina" significa que la expresión de una proteína distrofina está casi al mismo nivel de expresión que el de un control negativo mediante la medición mediante Western Blot o espectrometría de masas, o que la expresión de la proteína distrofina está por debajo del límite inferior de detección. Además, la transferencia de Western y la espectrometría de masas no están particularmente limitadas, siempre que sean métodos generalmente utilizados en el presente campo técnico. Como ejemplos de Western Blot y espectrometría de masas, se puede hacer referencia a los métodos experimentales aplicados en los presentes Ejemplos.

[0082] **5. Justificación Terapéutica**

La DMD es un trastorno muscular hereditario grave. Esta enfermedad ocurre con mayor frecuencia cuando la traducción de aminoácidos fuera de marco es causada por una Eliminación de uno o más exones del gen de la distrofina. La proteína distrofina funcional de un paciente, que es importante para la función muscular, no se expresa debido a dicha traducción de aminoácidos fuera de marco. Una forma menos grave del

trastorno, la distrofia muscular de Becker (DMO), ocurre con mayor frecuencia cuando la ausencia de uno o más exones en el gen de la distrofina da como resultado la traducción de aminoácidos en el marco de los exones restantes. Los pacientes con DMO generalmente tienen una progresión de la enfermedad más lenta y un menor grado de discapacidad. El tratamiento médico de los pacientes con DMD generalmente incluye tratamiento con glucocorticoides para retrasar la aparición de síntomas en los músculos de las extremidades o en los que apoyan la respiración. Existe una importante necesidad médica insatisfecha en los pacientes con DMD, como se expresa en la guía final de la FDA de febrero de 2018 "Distrofia muscular de Duchenne y distrofinopatías relacionadas: desarrollo de fármacos para orientación de tratamiento para la industria" (disponible en https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM450229.pdf.).

[0083] Un enfoque terapéutico para tratar a pacientes con DMD es emplear una estrategia de "omisión de exón" para producir proteína distrofina funcional que puede hacer que los pacientes con DMD pasen a un fenotipo de BMD. La omisión de exón permite la restauración del marco de lectura de aminoácidos debido a la omisión inducida del exón junto al exón faltante (Cirak et al., 2011; Voit et al., 2014; Yokota

et al., 2012). Con la omisión del exón 53, se expresa una proteína distrofina que es ligeramente más corta de lo normal pero que conserva una actividad funcional parcial. Se espera que la inyección de 250 mg de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) cambie el fenotipo de DMD a la enfermedad más leve de la DMO en la que la progresión de la enfermedad de los pacientes se ralentiza y la calidad de vida de los pacientes mejora (Cirak S, Arechavala-Gomeza V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, Abbs S, Garralda ME, Bourke J, Wells DJ, Dickson G, Wood MJ, Wilton SD, Straub V, Kole R, Shrewsbury SB, Sewry C, Morgan JE, Bushby K, Muntoni F. (2011). Salto de exón y restauración de distrofina en pacientes con distrofia muscular de Duchenne después del tratamiento sistémico con oligómeros de fosforodiamidato morfolino: un estudio abierto de fase 2 de escalada de dosis. Lancet 378: 595-605., Voit T, Topaloğlu H, Straub V, Muntoni F, Deconinck N, Campion G, De Kimpe SJ, Eagle M, Guglieri M, Hood S, Liefaard L, Lourbakos A, Morgan A, Nakielny J, Quarcoo N, Ricotti V, Rolfe K, Servais L, Wardell C, Wilson R, Wright P, Kraus JE. (2014). Seguridad y eficacia de drisapersen para el tratamiento de Distrofia muscular de Duchenne (DEMAND II): un estudio exploratorio, aleatorizado y controlado con placebo de fase 2. Lancet Neurol. 13(10):987-96., Y Yokota T, Nakamura A, Na gata T, Saito T, Kobayashi M, Aoki Y, Echigoya Y, Partridge

T, Hoffman EP, Takeda S. (2012). Restauración extensa y prolongada de la expresión de distrofina con omisión de múltiples exones mediada por vivo-morfolino en perros distróficos. Nucleic Acid Ther 22(5):306-15.).

[0084] Por lo tanto, la composición farmacéutica de la presente invención se administra a un paciente humano con DMD de acuerdo con el método de dosificación y administración de la presente invención antes mencionado, de modo que la DMD pueda tratarse.

El término "tratar" se usa en el presente documento para significar reducir los síntomas de DMD en un paciente.

[0085] El tratamiento que usa la composición farmacéutica de la presente invención de acuerdo con el método de dosificación y administración de la presente invención puede proporcionar al menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en los siguientes efectos (1) a (6) (en donde la media ± desviación estándar se muestra entre paréntesis):

(1) el valor medio del nivel de expresión de una proteína distrofina en el músculo esquelético del paciente aumenta 9 veces o más en comparación con el valor inicial, después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(2) un cambio en la velocidad obtenida desde el tiempo de reposo (TTSTAND) es de -0.055 veces/seg o más, o 0.024 ± 0.075 veces/seg o más en comparación con la línea de base, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(3) un cambio en la velocidad obtenida del tiempo para correr/caminar 10 metros (TTRW) es de -0.025 metros/seg o más, o 0.227 ± 0.251 metros/seg o más en comparación con la línea de base, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(4) un cambio en la velocidad obtenida a partir del tiempo para subir 4 escaleras (TTCLIMB) es -0.060 veces/seg o más, o 0.032 ± 0.088 veces/seg o más en comparación con la línea de base, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas;

(5) un cambio en la puntuación de la Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA) es -2.2 puntuaciones o más, o 0.8 ± 2.9 puntuaciones o más en comparación con el valor inicial, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas; y

(6) un cambio en la prueba de caminata de 6 minutos (6MWT) es de -7.5 metros o más, o 28.9 ± 36.3 metros o más en comparación con el valor inicial, en el momento de la semana 25 después de la administración de la composición farmacéutica durante 24 semanas.

[0086] Con respecto a los efectos (1) a (6) descritos anteriormente, el término "línea de base" significa un valor promedio en un grupo de pacientes no tratados. Además, el término "cambio" utilizado en los efectos (2) a (6) significa un cambio en los valores medios.

[0087] En una determinada realización, cuando la composición farmacéutica de la presente invención se administra a pacientes humanos de 7 a 9 años con distrofia muscular de Duchenne de acuerdo con el método de dosificación y administración de la presente invención antes mencionado durante 84 semanas, al menos una Se puede proporcionar un efecto seleccionado del grupo que consta de los siguientes efectos (7) a (12):

(7) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de aumento es inferior al 20% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(8) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de subir 4 escalones es inferior al 10% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(9) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de caminar de forma independiente es inferior al 10% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(10) no se observa una reducción en la velocidad de correr/caminar 10 metros debido al envejecimiento en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(11) no se observa una reducción en la velocidad de subir 4 escalones debido al envejecimiento en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento; y

(12) no se observa una reducción en la velocidad de aumento debido al envejecimiento en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento.

La semana en la que se ha iniciado el tratamiento se define como la primera semana, y los efectos descritos anteriormente (7) a (12) pueden proporcionarse en cualquier momento desde la 1a semana hasta la 85a semana, desde la 1a semana hasta la semana 80, de la 1ª semana a la 75ª semana, de la 1ª semana a la 70ª semana, de la 1ª semana a la 65ª semana y de la 1ª semana a la 60ª semana.

[0088] En una determinada realización, al menos un efecto seleccionado del grupo que consiste en los siguientes efectos (13) a (18) se proporciona al administrar la composición farmacéutica de la presente invención a pacientes humanos de 10 a 12 años con Duchenne muscular. distrofia de

acuerdo con la dosificación y el método de administración de la presente invención antes mencionados:

(13) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de aumento es inferior al 60% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(14) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad para subir 4 escalones es inferior al 50% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(15) el porcentaje de pacientes que pierden la capacidad de caminar de forma independiente es inferior al 50% en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(16) no se observa una reducción en la velocidad de correr/caminar 10 metros debido al envejecimiento en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento;

(17) se observa un período en el que aumenta la velocidad de subir 4 escalones en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento; y

(18) se observa un período en el que aumenta la velocidad de subida en el momento de la semana 85 después del inicio del tratamiento.

La semana en la que se ha iniciado el tratamiento se define como la primera semana, y los efectos descritos anteriormente (13) a (18) pueden proporcionarse en cualquier momento desde la 1a semana hasta la 85a semana, desde la 1a

semana hasta la semana 80, de la 1ª semana a la 75ª semana, de la 1ª semana a la 70ª semana, de la 1ª semana a la 65ª semana y de la 1ª semana a la 60ª semana.

[0089] Es decir, la composición farmacéutica de la presente invención puede proporcionar al menos uno de los efectos (1) a (18) descritos anteriormente.

[0090] **II. Segunda Realización**

En una segunda realización, la presente invención proporciona un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne, que comprende la administración intravenosa de una composición farmacéutica que comprende un oligómero antisentido que consta de una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consta de nucleótidos en las posiciones 36 a 56 desde la terminal 5' del exón 53 de un gen de distrofina humana, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, a un paciente humano una vez a la semana a una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive de la oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo (en lo sucesivo denominado "el método de tratamiento de la presente invención").

Los significados de las configuraciones individuales con respecto al método de tratamiento de la presente invención son los mismos que los de las configuraciones con respecto a

la composición farmacéutica de la presente invención ya explicadas en la sección "I. Primera Realización".

Además, el método de tratamiento de la presente invención puede proporcionar al menos un efecto de los efectos (1) a (18) explicados en la subsección "5. Justificación terapéutica" en la sección "I. Primera Realización".

[0091] **III. Tercera Realización**

Además, en una tercera realización, la presente invención proporciona un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consiste en nucleótidos en las posiciones 36 a 56 desde la terminal 5' del exón 53 de un gen de distrofina humana, o un gen farmacéuticamente aceptable. sal del mismo, o un hidrato del mismo, para su uso en un método para tratar a un paciente humano con distrofia muscular de Duchenne, en el que

el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, se administra por vía intravenosa al paciente humano una vez a la semana a una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80 mg/kg/semana inclusive (de ahora en adelante referido como "la realización de uso limitado de la presente invención").

Los significados de las configuraciones individuales con respecto a la realización de uso limitado de la presente

invención son los mismos que los de las configuraciones con respecto a la composición farmacéutica de la presente invención ya explicadas en la sección "I. Primera Realización".

Además, la realización de uso limitado de la presente invención puede proporcionar al menos un efecto de los efectos (1) a (18) explicados en la subsección "5. Justificación Terapéutica" de la sección "I. Primera Realización".

[0092] **IV. Cuarta Realización**

Además, en una cuarta realización, la presente invención proporciona el uso de un oligómero antisentido que consiste en una secuencia de bases complementaria a una secuencia que consiste en nucleótidos en las posiciones 36 a 56 desde la terminal 5’ del exón 53 de un gen de distrofina humana, o un una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de un paciente humano con distrofia muscular de Duchenne, donde

el oligómero antisentido, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o un hidrato del mismo, se administra por vía intravenosa al paciente humano una vez a la semana a una dosis de entre 40 mg/kg/semana inclusive y 80

mg/kg/semana inclusive (de ahora en adelante referido como "el uso de tipo suizo de la presente invención").

Los significados de las configuraciones individuales con respecto al uso de tipo suizo de la presente invención son los mismos que los de las configuraciones con respecto a la composición farmacéutica de la presente invención ya explicadas en la sección "I. Primera Realización".

Además, el uso de tipo suizo de la presente invención puede proporcionar al menos un efecto de los efectos (1) a (18) explicados en la subsección "5. Justificación terapéutica" de la sección "I. Primera Realización".

[0093] A continuación, la presente invención se describirá con más detalle en los siguientes ejemplos. Sin embargo, la presente invención no se limita al alcance de la invención que se muestra en estos ejemplos.

Ejemplos

[0094] **Ejemplo De Producción**

(1) Producción De Ácido 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamida-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico Soportado Sobre Resina De Aminometil Poliestireno

Paso 1: Producción De Ácido 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamida-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico

En una atmósfera de argón, 22.0 g de N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida, se suspendieron 7.04 g de 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) en 269 ml de diclorometano, y luego se añadieron 5.76 g de anhídrido succínico a la suspensión, y la mezcla se agitó luego a temperatura ambiente durante 3 horas. Posteriormente, se añadieron 40 ml de metanol a la solución de reacción y la solución obtenida se concentró luego a presión reducida. El residuo se sometió a una operación de extracción usando acetato de etilo y una solución acuosa de dihidrogenofosfato de potasio 0.5 M. La capa orgánica obtenida se lavó sucesivamente con una solución acuosa de dihidrogenofosfato de potasio 0.5 M, agua y una solución salina saturada. La capa orgánica obtenida se secó sobre sulfato de sodio y luego se concentró a presión reducida para obtener 25.9 g de un producto de interés.

[0095] **Paso 2: Producción De Ácido 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamida-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico Soportado Sobre Resina de Aminometil Poliestireno**

El ácido 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamida-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico (23.5 g), se disolvió en 336 ml de piridina (deshidratada) y, posteriormente, se añadieron a la solución 4.28 g de 4-DMAP y

40.3 g de hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida. Posteriormente, se añadieron a la mezcla 25.0 g de resina de aminometil poliestireno reticulada con DVB al 1% (fabricada por Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., A1543) y 24 mL de trietilamina, y la mezcla así obtenida se agitó a temperatura ambiente, durante 4 días. Una vez completada la reacción, la resina se recogió por filtración. La resina obtenida se lavó con piridina, metanol y diclorometano en este orden y luego se secó a presión reducida. A la resina obtenida se le añadieron 150 mL de tetrahidrofurano (deshidratado), 15 mL de anhídrido acético y 15 mL de 2,6-lutidina, y la mezcla obtenida se agitó luego a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se recogió por filtración y luego se lavó con piridina, metanol y diclorometano en este orden, seguido de secado a presión reducida, para obtener 33.7 g de un producto de interés.

Con respecto a la cantidad del producto de interés cargado, la cantidad molar de tritilo por gramo de resina se determinó midiendo la absorbancia UV a 409 nm de acuerdo con un método conocido. Se encontró que la cantidad cargada en la resina era 397.4 µmol/g.

[0096] **Condiciones De Medición UV**

Aparato: U-2910 (Hitachi, Ltd.)

Disolvente: ácido metanosulfónico

Longitud de onda: 265 nm

valor ε: 45000

[0097] **(2) Producción de PMO No. 8**

La PMO No. 8 apunta a la secuencia en las posiciones "36 a 56" en el exón 53, el grupo en la terminal 5´ del mismo es el "grupo (3)", y la secuencia de una porción de base del mismo es como se establece en SEQ ID NO: 3.

Ácido 4-{[(2S,6R)-6-(4-benzamida-2-oxopirimidin-1 (2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi}-4-oxobutanoico (Ejemplo de Referencia 1) (se transfirieron 2 g (800 µmol)) soportadas sobre una resina de aminometil poliestireno a un tanque de reacción, y luego se añadieron al mismo 30 ml de diclorometano, seguido de dejar la mezcla obtenida en reposo durante 30 minutos. Después de eso, la mezcla de reacción se lavó adicionalmente con 30 mL de diclorometano dos veces y se iniciaron los siguientes ciclos sintéticos. Se añadió un compuesto de monómero morfolino deseado en cada ciclo, para obtener la secuencia de bases del compuesto de interés.

[0098] **Tabla 3**

Paso	Reactivo	Cantidad (mL)	Tiempo (min)
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 de neutralización	30	1.5
8	Solución de neutralización	30	1.5
9	Solución de neutralización	30	1.5
10	Solución de neutralización	30	1.5
11	Solución de neutralización	30	1.5
12	Solución de neutralización	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 taponado	30	3.0
22	Solución de taponado	30	3.0
23	Diclorometano	30	0.5
24	Diclorometano	30	0.5
25	Diclorometano	30	0.5

Cabe señalar que una mezcla de ácido trifluoroacético (2 equivalentes) y trietilamina (1 equivalente) que se disolvió en una solución de diclorometano que contenía 1% (v/v) de etanol y 10% (v/v) 2,2,2-trifluoroetanol para dar como resultado un 3% (p/v) se usó como una solución de desbloqueo. Como solución neutralizante, se utilizó N,N-diisopropiletilamina disuelta en una solución de

diclorometano que contenía 2-propanol al 25% (v/v) para dar como resultado un 5% (v/v). Como solución de acoplamiento A, se usó un compuesto de monómero de morfolino disuelto en 1,3-dimetil-2-imidazolidinona que contenía 10% (v/v) de N, N-diisopropiletilamina para dar como resultado 0.15 M. Como solución de acoplamiento se utilizó B,N,N-diisopropiletilamina disuelta en 1,3-dimetil-2-imidazolidinona para dar como resultado un 10% (v/v). Como solución de taponado, se utilizó una mezcla de anhídrido acético al 20% (v/v) y 2,6-lutidina al 30% (v/v) que se disolvió en diclorometano.

[0099] La resina de aminometilpoliestireno soportada por PMO así sintetizada se recuperó del recipiente de reacción y luego se secó a temperatura ambiente a presión reducida durante 2 horas o más. La PMO que estaba soportada sobre la resina de aminometil poliestireno seca se colocó en un recipiente de reacción y luego se le añadieron 200 ml de amoniaco al 28%, agua-etanol (1/4), seguido de agitación de la mezcla obtenida a 55°C durante 15 horas. Después de eso, la resina de aminometil poliestireno se recogió por filtración y luego se lavó con 50 mL de agua-etanol (1/4). El filtrado obtenido se concentró a presión reducida. El residuo obtenido se disolvió en 100 ml de un disolvente mixto (4/1) de tampón de ácido acético-trietilamina 20 mM (tampón TEAA) y

acetonitrilo, y la solución obtenida se filtró luego a través de un filtro de membrana. El filtrado obtenido se purificó mediante HPLC en fase de reserva. Las condiciones aplicadas son las siguientes.

[0100] **Tabla 4**

Columna	**XTerra MS18 (Aguas, ϕ 50 x 100 mm, 1 CV = 200 mL)**
Tasa de flujo	60 mL/min
Temperatura de Columna	Temperatura Ambiente
Solución A	20 mM tampón TEAA
Solución B	CH_3CN
Gradiente	(B) conc. 20 → 50%/9 CV

Se analizó cada fracción y se recuperó un producto de interés utilizando 100 ml de acetonitrilo-agua (1/1). Se le añadieron 200 ml de etanol y luego la mezcla obtenida se concentró a presión reducida. El resultante se secó adicionalmente a presión reducida para obtener un sólido blanco. Al sólido obtenido, se le añadieron 300 ml de una solución acuosa de ácido fosfórico 10 mM, de modo que el sólido se suspendió en el mismo. A continuación, se añadieron a la suspensión 10 ml de una solución acuosa de ácido fosfórico 2 M y la mezcla obtenida se agitó luego durante 15 minutos. A continuación, se añadieron más 15 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M a la mezcla de reacción para la neutralización. A continuación, se añadieron más 15 ml de una solución acuosa de hidróxido de sodio 2 M a

la mezcla de reacción para alcalinizar la mezcla, y la mezcla se filtró luego a través de un filtro de membrana (0.45 µm). El resultante se lavó completamente con 100 mL de una solución acuosa de hidróxido de sodio 10 mM, para obtener un producto de interés en forma de solución acuosa.

La solución acuosa obtenida que contiene el producto de interés se purificó con una columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones aplicadas son las siguientes.

[0101] **Tabla 5**

Columna	**Fuente 30Q (GE Healthcare, ϕ 40 x 150 mm, 1 CV = 200 mL)**
Tasa de flujo	80 mL/min
Temperatura de Columna	Temperatura ambiente
Solución A	10 mM solución acuosa de hidróxido de sodio
Solución B	10 mM solución acuosa de hidróxido de sodio, 1 mM solución acuosa de cloruro de sodio
Gradiente	(B) conc. 5 → 35%/15 CV

Se analizó cada fracción (HPLC) y se obtuvo un producto de interés en forma de solución acuosa. A la solución acuosa obtenida, se le añadieron 225 ml de tampón de fosfato 0.1 M (pH 6.0) para su neutralización. La mezcla obtenida se filtró a través de un filtro de membrana (0.45 µm). Posteriormente, se llevó a cabo la ultrafiltración en las siguientes condiciones para la desalación.

[0102] **Tabla 6**

Filtro	PELLICON2 MINI FILTRO PLBC 3K

	Celulosa regenerada, Pantalla Tipo C
Tamaño	0.1 m^2

El filtrado se concentró para obtener aproximadamente 250 mL de una solución acuosa. La solución acuosa obtenida se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm). La solución acuosa obtenida se liofilizó para obtener 1.5 g de un compuesto de interés en forma de un sólido floculante blanco.

Valor calculado ESI-TOF-MS: 6924.82

Valor medido: 6923.54

[0103] **Ejemplo 1: Estudio De Fase 2 De EE. UU.**

El estudio de búsqueda de dosis de fase 2 de EE. UU., "Estudio NS-065NCNP-01-201" se inició en diciembre de 2016, bajo "IND127474". Este estudio se llevó a cabo con el número de reconocimiento de ClinicalTrials.gov "NCT02740972" con el título de "Estudio de seguridad y determinación de la dosis de NS-065/NCNP-01 en niños con distrofia muscular de Duchenne (DMD)". Los protocolos de implementación del estudio del presente estudio están disponibles en https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02740972, y su contenido se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. El presente estudio se dirigió principalmente a evaluar la seguridad de NS-065/NCNP-01

(Viltolarsen) para ser administrado en forma de infusión intravenosa por goteo a una dosis alta (80 mg/kg) y a una dosis baja (40 mg/kg) a pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD) susceptibles de tratamiento con omisión del exón 53. Además, otros objetivos del presente estudio incluyen la evaluación de la tolerabilidad, la función muscular y la fuerza muscular, la farmacocinética y la farmacodinamia.

[0104] Más específicamente, el presente estudio fue un estudio de Fase 2, multicéntrico, de dos períodos, aleatorizado, controlado con placebo, de búsqueda de dosis, y NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) se administró mediante infusión por goteo una vez a la semana para 24 semanas para niños ambulatorios de 4 años o más y menores de 10 años con DMD. Se inscribieron dos cohortes de niveles de dosis. El período 1 del estudio se llevó a cabo a doble ciego. Los pacientes aleatorizados recibieron infusiones intravenosas por goteo semanales de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) o placebo durante las primeras 4 semanas de su participación (Período 1), y luego, infusión intravenosa por goteo de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) durante 5 a 24 semanas (20 semanas de tratamiento activo - Período 2). El análisis de los datos de seguridad del período 1 de la cohorte de dosis de 40 mg/kg se completó antes de inscribir a los pacientes en la cohorte de

dosis de 80 mg/kg. Los pacientes que completaron el estudio de 24 semanas fueron elegibles para un estudio de extensión de etiqueta abierta.

[0105] La eficacia clínica se evaluó en visitas de estudio programadas regularmente. A todos los pacientes se les realizó una biopsia muscular del bíceps al inicio del estudio y una segunda biopsia muscular en la semana 24.

[0106] La seguridad se evaluó mediante la recopilación de eventos adversos (EA), análisis de laboratorio de sangre y orina, electrocardiogramas (ECG), signos vitales y exámenes físicos durante todo el estudio. Se tomaron muestras de sangre en serie en cuatro de las visitas del estudio para evaluar la farmacocinética de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen).

[0107] **<Tipo De Estudio: Intervencionista (Ensayo Clínico)>**

- Matrícula Real: 16 participantes.
- Asignación: Aleatorizada.
- Modelo De Intervención: Asignación Paralela.
- Enmascaramiento: Cuádruple (Participante, Proveedor De Atención, Investigador, Evaluador De Resultados).
- Finalidad Principal: Tratamiento.
- Fecha De Inicio Real Del Estudio: Diciembre De 2016.
- Fecha De Finalización Primaria: Marzo De 2018.

[0108] **<Grupos De Pacientes E Intervenciones>**

- Experimental: NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) 40 mg/kg

Se administró una infusión intravenosa por goteo de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) a una dosis de 40 mg/kg una vez a la semana durante 24 semanas a seis pacientes con DMD confirmada con eliminaciones genéticas susceptibles de tratamiento con omisión del exón 53.

- Experimental: NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) 80 mg/kg

Se administró a seis pacientes con DMD confirmada con eliminaciones genéticas susceptibles de un tratamiento que implicaba la omisión del exón 53 una infusión intravenosa por goteo de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) a una dosis de 80 mg/kg una vez a la semana durante 24 semanas.

- Comparador de placebo: Placebo

A dos o tres pacientes de cada uno de los grupos de dosis se les administró placebo como una infusión intravenosa por goteo una vez a la semana durante 4 semanas, seguida de 20 semanas de tratamiento abierto.

[0109] **<Criterios De Inclusión>**

- Varones ≥4 años y <10 años.

- Mutaciones confirmadas de DMD en el gen de la distrofina que es susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53 para restaurar el marco de lectura del ARNm de la distrofina.

- Pacientes capaces de caminar de forma independiente sin dispositivos de asistencia.

- Pacientes con capacidad para completar las evaluaciones de tiempo para estar de pie, tiempo para correr/caminar y tiempo para escalar.

- Dosis estable de glucocorticoide durante al menos 3 meses.

[0110] **<Criterios De Exclusión>**

- Enfermedad aguda en las 4 semanas previas a la primera dosis del medicamento del estudio.

- Evidencia de miocardiopatía sintomática. (La anomalía cardíaca asintomática en la investigación no sería excluyente).

- Alergia severa o hipersensibilidad a medicamentos.

- Problemas graves de comportamiento o cognitivos que impidan la participación en el estudio, a juicio del Investigador.

- Condición médica previa o en curso, historial médico, hallazgos físicos o anomalías de laboratorio que podrían afectar la seguridad, hacer poco probable que el tratamiento y el seguimiento se completen correctamente o afectar la evaluación de los resultados del estudio, en opinión del investigador.

- El paciente estaba tomando cualquier otro fármaco en investigación actualmente o en los 3 meses anteriores al inicio del tratamiento del estudio.

- El paciente se había sometido a una cirugía en los 3 meses anteriores a la primera administración prevista de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) o se había planificado la cirugía en cualquier momento durante la duración del estudio.

- El paciente había participado anteriormente en este estudio o en cualquier otro estudio durante el cual se le había administrado NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen).

[0111] En resumen, el estudio fue un estudio de 2 cohortes de 24 semanas que evaluó dosis de 40 mg/kg/semana y 80 mg/kg/semana en 16 pacientes varones susceptibles a un tratamiento que implicaba la omisión del exón 53 y con una dosis estable de glucocorticoides durante más de 3 años. meses. Los pacientes del grupo placebo en cada cohorte recibieron un período inicial de aleatorización de 4 semanas como control de los eventos adversos (resultados de seguridad). A partir de entonces, tanto los pacientes tratados con placebo como los tratados con activo continuaron el estudio durante un período de tratamiento de 20 semanas. El ensayo NS-065/NCNP-01-201 evaluó el efecto de la inyección de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) sobre la expresión de novo de la proteína distrofina después de 20-24 semanas de administración en dos cohortes de dosis: 40 mg/kg/semana dosis baja y dosis alta de 80 mg/kg/semana (como se muestra en la Figura 1). El objetivo del ensayo NS-065/NCNP-01-201

fue identificar una dosis segura y eficaz basada en la expresión de novo de la proteína distrofina en el músculo esquelético medida mediante la metodología Western Blot (WB) (criterio de valoración principal sustituto). Los criterios de valoración sustitutos secundarios incluyeron tinción por inmunofluorescencia (IF) y detección por espectrometría de masas de la expresión de novo de la proteína distrofina, así como detección por RT-PCR de los niveles de ARNm de la distrofina de novo. También se incluyeron varios criterios de valoración funcionales como criterios de valoración secundarios en el estudio de fase 2. Los criterios de valoración del ensayo NS-065/NCNP-01-201 fueron:

[0112] **<Criterios De Valoración Principales>**

- Seguridad y tolerabilidad de las administraciones intravenosas (IV) de dosis baja (40 mg/kg/semana) y dosis alta (80 mg/kg/semana) de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyectable.

- Los efectos de las dosis intravenosas bajas y altas de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyectable se determinaron como una inducción de la proteína distrofina en el músculo después de 20-24 semanas de tratamiento medido por Western Blot.

[0113] En la Figura 1, el cronograma para "Dosis alta: 80 mg/kg/semana" presentado en la mitad inferior se desplaza a un momento posterior del cronograma para "Dosis baja: 40

mg/kg/semana" presentado en la mitad superior para indican que la administración de dosis alta se inició solo después de que se confirmó la seguridad con la administración de dosis baja.

[0114] **Contenido De La Medida**:

1. Inducción de ARNm de distrofina en músculo medida por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para análisis de ARNm. (Marco de tiempo: 20-24 semanas de tratamiento)

La RT-PCR mide el empalme alterado del ARN de la distrofina. En este método, el ARN se aísla de la sección de biopsia de músculo congelado y se transcribe de forma inversa a ADNc. Los cebadores de PCR se diseñan flanqueando el sitio del exón 53 en el ARNm de distrofina. Las bandas de RT-PCR correspondientes a versiones específicas del ARNm de distrofina empalmado se visualizan mediante electroforesis en gel y se comparan las cantidades de diferentes isoformas de ARNm. Si el fármaco se une con éxito al ARN diana, el exón 53 se excluye de las transcripciones de ARNm resultantes.

2. Inducción de proteína distrofina en músculo medida por transferencia Western para análisis de proteínas. (Marco de tiempo: 20-24 semanas de tratamiento)

[0115] La principal medida de resultado bioquímica es la medición del aumento inducido por fármacos en la producción

de distrofina mediante inmunotransferencia (Western Blot). La inmunotransferencia de distrofina utiliza criosecciones de biopsia muscular solubilizadas, con proteínas fraccionadas por peso molecular mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE), electrotransferencia a nitrocelulosa y luego incubación de nitrocelulosa con anticuerpos para detectar la proteína distrofina. La señal de inmunotransferencia para distrofina de la biopsia de un paciente se compara luego con la señal de una curva estándar de distrofina en el mismo gel (DMD mixta y controles normales). Esto proporciona una evaluación semicuantitativa del contenido de distrofina en el músculo.

[0116] **Estudio De Fase 2 De EE. UU.: Eficacia**

Medida De Resultado 1

Los resultados obtenidos de la medida de resultado 1 (es decir, detección por RT-PCR de niveles de ARNm de distrofina de novo) fueron los siguientes.

[0117] **Tabla 7**

Dosis	Media basal % (desviación estándar)	Media durante tratamiento % (desviación estándar)
40 mg/kg/semana	0.0 (0.0)	17.4 (7.2)
80 mg/kg/semana	0.0 (0.0)	43.9 (16.7)

[0118] **Medida De Resultado 2**

Los resultados obtenidos de la medida de resultado 2 (es decir, la medición de la expresión de novo de la proteína distrofina en el músculo esquelético mediante la metodología de transferencia Western) representaron un aumento de 19.0 veces (para 40 mg/kg/semana durante 24 semanas) y un aumento de 9.8 veces (para 80 mg/kg/semana durante 24 semanas) desde el inicio en comparación con un valor promedio del inicio y el del tratamiento, y un aumento de 27.2 veces (para cada uno de 40 y 80 mg/kg/semana durante 24 semanas) que se calculó como un valor promedio de la tasa de aumento para cada paciente. Los datos obtenidos se resumen en la siguiente Tabla 8 y Figura 2.

[0119] **Tabla 8**

Dosis	**Media basal % (rango, desviación estándar)**	**Media durante tratamiento % (rango, desviación estándar)**	**Aumento de veces 1)**	**Aumento de veces 2)**
40mg/kg/semana	0.3 (0.1-0.4, 0.1)	5.7 (3.2-10.3, 2.4)	19.0	27.2
80mg/kg/semana	0.6 (0.1-2.6, 0.8)	5.9 (1.1-14.4, 4.5)	9.8	27.2

1) Comparación entre el valor medio de la línea de base y el del tratamiento.

2) Valor medio de la tasa de incremento de cada paciente.

[0120] El grado de rescate de distrofina por NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) (40 o 80 mg/kg/semana, 24 semanas) fue aproximadamente de 3 a 7 veces o de 8.8 a 9.7 veces mayor que lo informado anteriormente para Exondys 51® (eteplirsen) (30 mg/kg/semana, 48 y 180 semanas) susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 51 en una estimación moderada, que fue lanzado por Sarepta Therapeutics en 2016. Específicamente, con fines comparativos, los siguientes son los correspondientes Datos de transferencia de Western para Exondys 51® (eteplirsen). En 3 de 16 pacientes a los que se les administró NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) durante 24 semanas, el nivel de distrofina aumentó en más del 10% desde el inicio. Se observó un aumento en el valor de distrofina del 3% o más en 12 de 16 pacientes a los que se les administró NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) durante 24 semanas. Hoffman et al. han informado que: "Entre los pacientes con distrofia de Duchenne (<3% de distrofina del nivel normal) o distrofia de Becker y un fenotipo de distrofina anormal, había una clara correlación entre la gravedad del fenotipo clínico y los resultados de la evaluación de distrofina". (Eric P. Hoffman, et al., "Characterization of Distrofina in Muscle-Biopsy Specimens

from Patients with Duchenne's or Becker's Muscular Dystrophy." N. Ingl. J. Med., 318: 1363-1368 (1988)).

[0121] - Western Blot eteplirsen: un aumento de 2.8 veces, 0.16% → 0.44% (30 mg/kg/semana durante 48 semanas). ("En los 12 pacientes con resultados evaluables, el nivel de distrofina antes del tratamiento fue del 0.16% ± 0.12% (media ± desviación estándar) del nivel de distrofina en un sujeto sano y del 0.44% ± 0.43% después de 48 semanas de tratamiento con EXONDYS 51 ($p<0.05$)") (disponible en https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/PediatricAdvisoryCommittee/UCM557917.pdf.).

- Western Blot eteplirsen: un aumento de 3.1 veces, 0.3% → 0.93% (30 mg/kg/semana durante 180 semanas). ("En las transferencias Western de biopsias de extensor digitorum brevis (EDB), los niveles de distrofina promediaron aproximadamente el 0.3% de lo normal, pero variaron de indetectable a ≈1% de lo normal o algo más alto". "Por Western Blot, el método cuantitativo más preciso utilizado según el solicitante, el nivel medio de distrofina después de ~3.5 años de tratamiento con eteplirsen fue 0.93% ± 0.84% de lo normal (media ± desviación estándar)" (disponible en https://www.fda.gov/downloads/advisorycommittees/committeesmeetingmaterials/drugs/peripheralandcentralnervoussystemdrugsadvisorycommittee/ucm497063.pdf.)

- Western Blot eteplirsen: 0.93% en la semana 180, rango 0%-2.47% (30 mg/kg/semana durante 180 semanas) (Kenji Rowel Q Lim, et al., "Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy.". Des. Devel. Ther., 11: 533-545(2017); https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5338848/)

- Además: "Para eteplirsen, no se observaron diferencias en la dosis-respuesta para la cantidad de distrofina producida entre una dosis semanal de 30 mg/kg y 50 mg/kg en los estudios realizados en la semana 180, lo que sugiere que este enfoque puede no tener éxito para otros exones ". (Kenji Rowel Q Lim, et al., " Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy.". Des. Devel. Ther., 11: 533-545(2017); https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5338848/).

[0122] También se muestra que Viltolarsen logró efectos superiores en comparación con SRP-4053 (golodirsen; de Sarepta), que es un oligonucleótido morfolino para pacientes con DMD susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, en particular en la mayor cantidad de nivel de distrofina observado. Específicamente, con fines de comparación, los siguientes son los datos de transferencia Western correspondientes para SRP-4053 (golodirsen), que se obtuvieron después de 48 semanas de administración en lugar de 24 semanas de administración para Viltolarsen.

[0123] - Western Blot con golodirsen: 0.095% → 1.019% (30 mg/kg durante 48 semanas). ("La proteína distrofina media aumentó a un 1.019% de lo normal en comparación con un valor inicial medio del 0.095% de lo normal ($p<0.001$) según lo medido por Western Blot, el criterio de valoración biológico principal del estudio, que representa un aumento de 10.7 veces desde el valor inicial") (disponible en http://investorrelations.sarepta.com/news-releases/news-release-details/sarepta-therapeutics-announces-positive-results-its-study).

- Western Blot con golodirsen: Mínimo 0.09%, Máximo 4.30% (30 mg/kg/semana durante 48 semanas). Se observó un aumento en el nivel de distrofina del 3% o más en 2 de cada 25 pacientes (22vo Congreso Internacional de la Sociedad Mundial del Músculo (3-7 de octubre de 2017, St. Malo, Francia),(http://www.google.co.jp/url?sa=t&source=web&cd=2&ved=2ahUKEwid7ZTQ9OrbAhUETLwKHX3xDk8QFjABegQIARAB&url=http%3A%2F%2Finvestorrelations.sarepta.com%2Fstatic-files%2F64d8d897-2e4a-4119-80b4-115cbae17993&usg=AOvVaw1Amh1Mq1VauvLkPvYWfVdR).

[0124] **<u>Estudio De Fase 2 De EE. UU.: Seguridad</u>**

En cuanto a los datos de seguridad de 16 pacientes con DMD tratados con dosis altas y bajas de NS 065/NCNP-01 (Viltolarsen) (40 mg/kg/semana y 80 mg/kg/semana), no se

plantearon preocupaciones importantes en la ejecución del estudio. calidad de los datos o seguridad de los participantes. Ningún participante interrumpió el tratamiento en el momento de las 36 semanas. Específicamente, no hubo eventos adversos graves, ningún evento adverso que condujera a la interrupción del tratamiento y ningún evento adverso relacionado con el medicamento. Todos los eventos adversos (EA) fueron leves o moderados.

[0125] **Ejemplo 2: Estudio de Fase 2 de EE. UU. y Canadá**

El estudio de búsqueda de dosis de fase 2 de EE. UU., "Estudio NS-065/NCNP-01-201" se inició en diciembre de 2016, bajo "IND127474". Este estudio se llevó a cabo con el número de reconocimiento de ClinicalTrials.gov "NCT02740972" con el título de "Estudio de seguridad y determinación de la dosis de NS-065/NCNP-01 en niños con distrofia muscular de Duchenne (DMD)". El protocolo clínico del presente estudio está disponible en https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02740972, y el contenido del mismo se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. El presente estudio se dirigió principalmente a evaluar la seguridad de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) para ser administrado en forma de infusión intravenosa por goteo a una dosis alta (80 mg/kg) y a una dosis baja (40 mg/kg) a pacientes con distrofia muscular de Duchenne (DMD)

susceptibles de tratamiento con omisión del exón 53. Además, otros objetivos del presente estudio incluyen la evaluación de la tolerabilidad, la función muscular y la fuerza muscular, la farmacocinética y la farmacodinamia.

Más específicamente, el presente estudio fue un estudio de Fase 2, multicéntrico, de dos períodos, aleatorizado, controlado con placebo, de búsqueda de dosis, y NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) se administró mediante infusión por goteo una vez a la semana para 24 semanas para niños ambulatorios de 4 años o más y menores de 10 años con DMD. Se inscribieron dos cohortes de niveles de dosis. El período 1 del estudio se llevó a cabo a doble ciego. Los pacientes aleatorizados recibieron infusiones intravenosas por goteo semanales de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) o placebo durante las primeras 4 semanas de su participación (Período 1), y luego, infusión intravenosa por goteo de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) durante 5 a 24 semanas (20 semanas de tratamiento activo - Período 2). El análisis de los datos de seguridad del período 1 de la cohorte de dosis de 40 mg/kg se completó antes de inscribir a los pacientes en la cohorte de dosis de 80 mg/kg. Los pacientes que completaron el estudio de 24 semanas fueron elegibles para un estudio de extensión de etiqueta abierta.

[0126] La eficacia clínica se evaluó en visitas de estudio programadas regularmente. A todos los pacientes se

les realizó una biopsia muscular del bíceps al inicio del estudio y una segunda biopsia muscular en la semana 24.

[0127] La seguridad se evaluó mediante la recopilación de eventos adversos (EA), análisis de laboratorio de sangre y orina, electrocardiogramas (ECG), signos vitales y exámenes físicos durante todo el estudio. Se tomaron muestras de sangre en serie en cuatro de las visitas del estudio para evaluar la farmacocinética de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen).

[0128] **<Tipo De Estudio: Intervencionista (Ensayo Clínico)>**

- Matrícula real: 16 participantes.
- Asignación: Aleatorizada.
- Modelo de intervención: Asignación paralela.
- Enmascaramiento: Cuádruple (participante, proveedor de atención, investigador, evaluador de resultados).
- Finalidad principal: Tratamiento.
- Fecha de inicio real del estudio: diciembre de 2016.
- Fecha de finalización primaria: marzo de 2018.

[0129] **<Grupos De Pacientes E Intervenciones>**

- Experimental: NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) 40 mg/kg

Se administró una infusión intravenosa por goteo de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) a una dosis de 40 mg/kg una vez a la semana durante 24 semanas a seis pacientes con DMD confirmada con eliminaciones genéticas susceptibles de tratamiento con omisión del exón 53.

- Experimental: NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) 80 mg/kg

A cinco pacientes con DMD confirmada con eliminaciones genéticas susceptibles de un tratamiento que implicaba la omisión del exón 53 se les administró una infusión intravenosa por goteo de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) a una dosis de 80 mg/kg una vez a la semana durante 24 semanas.

- Comparador de placebo: Placebo

A dos pacientes en el grupo de dosis de 40 mg/kg y a tres pacientes en el grupo de dosis de 80 mg/kg se les administró placebo cada uno como una infusión intravenosa por goteo una vez a la semana durante 4 semanas seguido de 20 semanas de tratamiento abierto.

[0130] **<Criterios De Inclusión>**

- Hombres ≥4 años de edad en el momento del consentimiento y <10 años de edad en el momento de la primera perfusión intravenosa por goteo.

- Mutaciones confirmadas de DMD en el gen de la distrofina que es susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53 para restaurar el marco de lectura del ARNm de la distrofina.

- Pacientes capaces de caminar de forma independiente sin dispositivos de asistencia.

- Pacientes con capacidad para participar en las evaluaciones del tiempo para estar de pie (TSTAND), el tiempo

para correr/caminar 10 metros (TTRW) y el tiempo para subir 4 escalones (TTCLIMB), que fueron juzgados por el evaluador de función motora.

- Dosis estable de glucocorticoide durante al menos 3 meses.

[0131] **<Criterios De Exclusión>**

- Enfermedad aguda en las 4 semanas previas a la primera dosis del medicamento del estudio.

- Evidencia de miocardiopatía sintomática. (Las anomalías cardíacas asintomáticas en la investigación no son excluyentes).

- Alergia severa o hipersensibilidad a medicamentos.

- Problemas graves de comportamiento o cognitivos que impidan la participación en el estudio, a juicio del Investigador.

- Condición médica previa o en curso, historial médico, hallazgos físicos o anomalías de laboratorio que podrían afectar la seguridad, hacer poco probable que el tratamiento y el seguimiento se completen correctamente o afectar la evaluación de los resultados del estudio, en opinión del investigador.

- El paciente estaba tomando cualquier otro fármaco en investigación actualmente o en los 3 meses anteriores al inicio del tratamiento del estudio.

- El paciente se había sometido a una cirugía en los 3 meses anteriores a la primera administración prevista de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) o se había planificado la cirugía en cualquier momento durante la duración del estudio.

- El paciente había participado anteriormente en este estudio o en cualquier otro estudio durante el cual se le había administrado NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen).

[0132] En resumen, el estudio fue un estudio de 2 cohortes de 24 semanas que evaluó dosis de 40 mg/kg/semana y 80 mg/kg/semana en 16 pacientes varones susceptibles a un tratamiento que implicaba la omisión del exón 53 y con una dosis estable de glucocorticoides durante más de 3 años. meses. Los pacientes del grupo placebo en cada cohorte recibieron un período inicial de aleatorización de 4 semanas como control de los eventos adversos (resultados de seguridad). A partir de entonces, tanto los pacientes tratados con placebo como los tratados con activo continuaron el estudio durante un período de tratamiento de 20 semanas. El estudio NS-065/NCNP-01-201 evaluó el efecto de la inyección de 250 mg de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) sobre la expresión de novo de la proteína distrofina después de 20-24 semanas de administración en dos cohortes de dosis: 40 mg/kg/semana dosis baja y 80 mg/kg/semana dosis alta (como se muestra en la Figura 3). El objetivo del estudio NS-065/NCNP-

01-201 fue identificar una dosis segura y eficaz basada en la expresión de novo de la proteína distrofina en el músculo esquelético medida mediante la metodología Western Blot (WB) (criterio de valoración principal sustituto). Los criterios de valoración sustitutos secundarios incluyeron tinción por inmunofluorescencia (IF) y detección por espectrometría de masas de la expresión de novo de la proteína distrofina, así como detección por RT-PCR de los niveles de ARNm de la distrofina de novo. También se incluyeron varios criterios de valoración funcionales como criterios de valoración secundarios en el estudio de fase 2. Los criterios de valoración del estudio NS-065/NCNP-01-201 fueron:

[0133] **<Criterios De Valoración Principales>**

- Seguridad y tolerabilidad de las administraciones intravenosas (IV) de dosis baja (40 mg/kg/semana) y dosis alta (80 mg/kg/semana) de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyectable 250 mg.

- Efectos de dosis IV bajas y altas de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyectable 250 mg sobre la inducción de proteína distrofina en el músculo después de 20-24 semanas de tratamiento medido por Western Blot.

- Concentración de fármaco en sangre de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen)

[0134] **<Criterios De Valoración Secundarios>**

- Evaluar los efectos de la administración intravenosa de dosis bajas y altas de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyectable 250 mg sobre la inducción de ARNm de distrofina y proteína en el músculo después de 20-24 semanas de tratamiento, medido por RT-PCR para Análisis de ARNm y métodos de tinción por inmunofluorescencia y espectrometría de masas para análisis de proteínas.

- Investigar los efectos de la administración intravenosa de dosis bajas y altas de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen) Inyectable 250 mg después de 20-24 semanas de tratamiento sobre la fuerza muscular, la movilidad y la capacidad de ejercicio funcional, medido por el tiempo De pie (TTSTAND), tiempo para correr/caminar 10 metros (TTRW), tiempo para subir 4 escalones (TTCLIMB), evaluación ambulatoria North Star (NSAA), prueba de caminata de 6 minutos (6MWT) y prueba muscular cuantitativa (QMT) versus un grupo de control de historia natural emparejado.

[0135] En la Figura 3, el cronograma para "Dosis alta: 80 mg/kg/semana" presentado en la mitad inferior se desplaza a un momento posterior del cronograma para "Dosis baja: 40 mg/kg/semana" presentado en la mitad superior para indican que la administración de dosis alta se inició solo después de que se confirmó la seguridad con la administración de dosis baja.

[0136] **Criterios De Valoración Secundarios Del Estudio De Fase 2 de EE. UU. Y Canadá**: pruebas de función cronometradas versus comparador de historia natural externo no tratado (Grupo Cooperativo Internacional de Investigación Neuromuscular (CINRG) Estudio de Historia Natural de Duchenne (DNHS)).

Los pacientes inscritos en el estudio NS-065/NCNP-01-201 de fase 2 de EE. UU./Canadá fueron evaluados clínicamente para determinar la función muscular al inicio, en la semana 13 y en la semana 25. No se realizó un ajuste para el período de placebo de cuatro semanas para este propósito. Estas evaluaciones incluyeron varios tipos de pruebas de función cronometradas: tiempo para estar de pie en decúbito supino (TTSTAND); Tiempo para correr/caminar 10 metros (TTRW); Hora de subir cuatro escalones (TTCLIMB); Prueba de marcha de 6 minutos (6MWT); y Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA). Los cambios a lo largo del tiempo se compararon con las trayectorias de la enfermedad en pacientes emparejados estudiados en CINRG DNHS.

[0137] CINRG DNHS es un estudio en el que se siguió a cada uno de 440 pacientes con DMD durante un período de años (con la duración total del estudio de aproximadamente 10 años). CINRG son las siglas de Cooperative International Neuromuscular Research Group, y "es un consorcio de

investigadores médicos y científicos de centros académicos y de investigación que comparten el objetivo común de querer impactar positivamente las vidas de los pacientes con enfermedades neuromusculares y sus familias mediante la realización de estudios clínicos bien controlados. "(de http://www.cinrgresearch.org/). DNHS son las siglas de Duchenne Natural History Study y es "el mayor estudio prospectivo multicéntrico de historia natural hasta la fecha sobre la distrofia muscular de Duchenne (DMD)" establecido por CINRG (de http://www.cinrgresearch.org/duchenne-natural-history/). (McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Han JJ, Escolar DM, Florence JM, Duong T, Arrieta A, Clemens PR, Hoffman EP y Cnaan A, "Investigadores del CINRG. El grupo cooperativo internacional de investigación neuromuscular estudio de la historia natural de Duchenne: el tratamiento con glucocorticoides preserva los hitos funcionales clínicamente significativos y reduce la tasa de progresión de la enfermedad, medida mediante pruebas musculares manuales y otras medidas de resultado de ensayos clínicos de uso común.", Muscle Nerve, 48(1), 32-54(2013), Henricson EK, Abresch RT, Cnaan A, Hu F, Duong T, Arrieta A, Han J, Escolar DM, Florence JM, Clemens PR, Hoffman EP y McDonald CM, "Investigadores del CINRG. El grupo cooperativo internacional de investigación neuromuscular: Estudio de historia natural

de Duchenne: el tratamiento con glucocorticoides preserva hitos funcionales clínicamente significativos y reduce la tasa de enfermedad progresión según lo medido por la prueba muscular manual y otras medidas de resultado de ensayos clínicos de uso común." Muscle Nerve, 48 (1), 55-67 (2013), y McDonald CM, Henricson EK, Abresch RT, Duong T, Joyce NC, Hu F, Clemens PR, Hoffman EP, Cnaan A y Gordish-Dressman H, "Investigadores del CINRG. Efectos a largo plazo de los glucocorticoides sobre la función, la calidad de vida y la supervivencia en pacientes con distrofia muscular de Duchenne: un estudio de cohorte prospectivo.”, "Lancet, 391(10119), 451-461 2018)).

[0138] El ensayo NS-065/NCNP-01-201 fue realizado por centros clínicos que participan en la red CINRG. Los procedimientos operativos estándar (manuales clínicos) y los protocolos de capacitación del evaluador clínico fueron muy similares para el ensayo clínico NS-065/NCNP-01-201 y el CINRG DNHS. El emparejamiento de los pacientes inscritos en NS-065/NCNP-01-201 versus CINRG DNHS se realizó utilizando el siguiente conjunto de criterios.

- Niños entre 4 y <10.5 años al inicio del estudio.

- Pacientes con al menos 12 meses de datos de pruebas funcionales cronometradas.

- Región geográfica: América del Norte (EE. UU. Y Canadá).

- Con esteroides durante al menos 3 meses y uso continuo de esteroides durante el período de observación de 12/24 meses.

- No puede participar en otro ensayo clínico.

[0139] Consulta de la base de datos CINRG DNHS para pacientes emparejados con los pacientes inscritos en el ensayo clínico NS-065/NCNP-01-201, sin especificar una mutación de distrofina susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 53, pero excluyendo a aquellos con un exón 3-7 la Eliminación y aquellos con una Eliminación de distrofina susceptible de un tratamiento que implica la omisión del exón 44, dieron como resultado 69 sujetos como se muestra en la Tabla 9 a continuación. Aquellos con una Eliminación del exón 3-7 y aquellos con una Eliminación de distrofina susceptibles de un tratamiento que implica la omisión del exón 44 fueron excluidos porque se ha informado que estos pacientes exhiben síntomas comparativamente leves.

[0140] **Tabla 9: Pacientes Emparejados de CINRG DNHS**

Parámetro	**Omisión Exón 53 n = 6**	**No Omisión del Exón 53 n = 63**	**Total n = 69**
Edad media, años (rango)	6.8 (4.5 - 10.3)	7.4 (4.0 - 10.5)	7.3 (4.0 - 10.5)
Peso medio, kg (rango)	25.0 (16.6 - 39.1)	25.6 (15.1 - 50.6)	25.6 (15.1 - 50.6)
Tipo de eliminación,	2 (33%)	9 (14%)	11 (16%)

n (%)			
Eliminación única	4 (67%)	31 (49%)	35 (51%)
Eliminaciones múltiples	0	2 (3%)	2 (3%)
Duplicación exón único	0	3 (5%)	3 (4%)
Duplicaciones exón múltiple	0	16 (25%)	16 (23%)
Sin elim/dup grandes			

* Omisión sin exón 53: Dos pacientes no tenían datos sobre el tipo de Eliminación.

[0141] En la fila superior de la Tabla 9, "Omisión del Exón 53" significa pacientes con DMD susceptibles de un tratamiento que involucra la omisión del exón 53, mientras que "Sin Omisión del Exón 53" significa todos los demás pacientes (pero con las exclusiones mencionadas anteriormente). En la fila inferior de la Tabla 9, "Sin elim/ dup grandes" abarca otras categorías tales como mutaciones puntuales (que no son susceptibles de un tratamiento que implique la omisión de exón).

[0142] El número de pacientes de CINRG DNHS que tenían datos para 6MWT fue menor que el número de pacientes para los otros resultados. Esto se debe a que 6MWT se agregó tarde en el protocolo CINRG DNHS, lo que generó una cantidad limitada de datos en relación con las otras pruebas de función cronometradas.

[0143] La comparación de las trayectorias de la enfermedad durante 24 semanas entre los 16 pacientes

inscritos en NS-065/NCNP-01-201 y los 69 pacientes inscritos en CINRG DNHS mostró que los pacientes en el comparador de historia natural tenían disminuciones en el rendimiento de las pruebas de función cronometradas durante las 24 período de tiempo de la semana. Por el contrario, los pacientes inscritos en NS-065/NCNP-01-201 mostraron una mejora promedio en las pruebas de función cronometradas durante el mismo período de tiempo de 24 semanas. Tres de estas mejoras alcanzaron significación estadística: TTRW (en la semana 13 y en la semana 25); TTSTAND (en la semana 25); y 6MWT (en la semana 25). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis de 40 mg/kg/semana y 80 mg/kg/semana de NS 065/NCNP-01 (Viltolarsen).

[0144] La Figura 4 (un total de cinco gráficos y una tabla) muestra comparaciones de los cambios desde el inicio en las pruebas de función cronometradas durante un período de 24 semanas en pacientes inscritos en NS-065/NCNP-01-201 (indicado como "Viltolarsen" en azul sólido línea) y pacientes emparejados en CINRG DNHS (indicado como "DNHS" en línea roja discontinua).

[0145] En los cinco gráficos de la Figura 4, "Viltolarsen" es el nombre común internacional (DCI) de NS-065/NCNP-01. Además, en todos los gráficos, los cambios desde el inicio se compararon entre los grupos administrados por

Viltolarsen y los grupos de pacientes del CINRG DNHS utilizando un modelo mixto basado en máxima verosimilitud restringida (REML) para análisis de medidas repetidas (MMRM).

[0146] **(1) Pruebas De Función Temporizadas**

Las pruebas de función cronometradas fueron TTSTAND, TTRW, TTCLIMB y 6MWT. TTSTAND y TTRW se pre especificaron como medidas de resultado distintas y separadas, y se evaluaron en función del tiempo y una escala de 6 puntos. TTSTAND y TTRW también son componentes de la NSAA. Por lo tanto, se midieron una vez y los datos se utilizaron como criterio de valoración independiente y como parte de la prueba combinada de la NSAA. TTSTAND y TTRW se describen más adelante en el contexto de la escala combinada NSAA. Se utilizó TTCLIMB para evaluar el tiempo (en segundos) que le tomó a un paciente subir 4 escalones. Cabe señalar que el protocolo clínico mencionado en el "Estudio de fase 2 de EE. UU./Canadá" anterior describía incorrectamente la prueba TTCLIMB como administrada como parte de la NSAA.

[0147] La 6MWT es una prueba ampliamente utilizada y aceptada en numerosas enfermedades; En este estudio se utilizó la versión adaptada para su uso en DMD. Esta prueba se considera un medio simple, estandarizado, de baja tecnología y rentable para evaluar clínicamente: 1) el estado motor funcional; y 2) respuestas integradas y globales al

ejercicio. Para realizar la presente prueba, se colocaron 2 puntos (conos) a 25 metros de distancia, y se pidió a los pacientes que caminaran de un lado a otro entre los conos de forma rápida y segura durante 6 minutos. Se registró la distancia total en metros que el paciente caminó en 6 minutos. El evaluador clínico midió el número de pasos dados por el paciente durante los primeros 50 metros y el total de metros caminado en 6 minutos (Craig M. McDonald, MD, Erik K. Henricson, MPH, Jay J. Han, MD, R. Ted Abresch MS, Alina Nicorici, BS, Gary L. Elfring, MS, Leone Atkinson MD, PhD, Allen Reha BS, Samit Hirawat MD, and Langdon L. Miller MD, " La prueba de caminata de 6 minutos como una nueva medida de resultado en la distrofia muscular de Duchenne," Muscle & Nerve, Vol. 41, pp. 500-510, April 2010, Wiley Periodicals, Inc. and Craig M. McDonald, MD, Erik K. Henricson, MPH, R. Ted Abresch, MS, Julaine Florence, PhD, Michelle Eagle, PhD, Eduard Gappmaier, PhD, Allan M. Glanzman, DPT, Robert Spiegel, MD, Jay Barth, MD, Gary Elfring, MS, Allen Reha, MS, and Stuart W. Peltz, PhD, "La prueba de marcha de 6 minutos y otros criterios de valoración clínicos en la distrofia muscular de Duchenne: fiabilidad, validez concurrente y diferencias mínimas clínicamente importantes de un estudio multicéntrico, Muscle & Nerve, Vol. 48, pp. 357-368, Septiembre 2013, Wiley Periodicals, Inc.

[0148] Las evaluaciones de Quantitative Muscle Testing (QMT) están diseñadas para medir la producción de fuerza muscular durante una contracción isométrica y son un método bien establecido para medir la debilidad muscular en la enfermedad neuromuscular. Los métodos aquí utilizan el sistema muscular cuantitativo CINRG (CQMS). CQMS incluyó un proceso de retroalimentación audiovisual que aumenta el cumplimiento de los niños con DMD. Se colocó a los pacientes en una mesa de exploración con un sistema de respaldo para eliminar la necesidad de estabilización manual de la espalda. Después de una sola administración de práctica, cada paciente completó una evaluación QMT puntuada (realice 2 pruebas; el más alto de los 2 valores utilizados para el análisis de datos). La QMT se realizó registrando la fuerza en libras a través de una interfaz de computadora directa con un medidor de tensión. Las posiciones de prueba y el orden de prueba se estandarizaron. Se realizaron pruebas bilaterales de los grupos musculares que se enumeran a continuación (Mayhew JE, Florence JM, Mayhew TP, Henricson EK, Leshner RT, Mccarter RJ, et al., "Medidas de resultado alternativas fiables en ensayos clínicos multicéntricos de distrofia muscular de Duchenne", Muscle & Nerve, 2007; 35 (1): 36-42. Epub 2006/09/14.):

- Empuñadura.

- Flexores del codo (bíceps).
- Extensores de codo (tríceps).
- Flexores de rodilla (isquiotibiales).
- Extensores de rodilla (cuádriceps).

[0149] Para QMT, se observaron pequeñas disminuciones medias en la fuerza en todos los parámetros durante el período de tratamiento de 24 semanas, con la excepción de los extensores del codo. Los extensores del codo mostraron pequeños aumentos (mejoras) en la fuerza. Ninguno de estos cambios con respecto al valor inicial fue estadísticamente significativo en la semana 25.

[0150] Las pruebas de fuerza y función se realizaron en el siguiente orden: TTSTAND, TTRW, TTCLIMB, NSAA, 6MWT y QMT.

[0151] **(2) Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA)**

La NSAA es una escala funcional de 17 elementos calificada por un médico diseñada originalmente para niños con DMD capaces de deambular al menos 10 metros (ES Mazzone, S. Messina, G. Vasco, M. Main, M. Eagle, A.D' Amico, L. Doglio, L. Politano, F. Cavallaro, S. Frosini, L. Bello, F. Magri, A. Corlatti, E. Zucchini, B. Brancalion, F. Rossi, M. Ferretti, MG Motta, MR Cecio, A. Berardinelli, P. Alfieri, T. Mongini, A. Pini, G. Astrea, R. Battini, G. Comi, E. Pegoraro, L. Morandi, M. Pane, C. Angelini, C. Bruno, M. Villanova, G. Vita, MA Donati, E. Bertini y E. Mercuri, "Confiabilidad de

la evaluación ambulatoria North Star en un entorno multicéntrico", Trastornos neuromusculares, Vol. 19, Número 7, págs. Julio de 2009, Elsevier BV). Esta herramienta de evaluación evalúa las actividades funcionales, como estar de pie, levantarse del suelo, negociar pasos, saltar y correr. La evaluación se basa en una escala de calificación de 3 puntos de: 2= capacidad para realizar la prueba normalmente; 1= método modificado o ayuda para realizar la prueba; y 0= incapaz de realizar la prueba. Por lo tanto, una puntuación total puede variar de 0 (completamente no ambulante) a 34 (sin deterioro) en estas evaluaciones. Se registraron las puntuaciones de los elementos de prueba individuales y una puntuación total. TTSTAND y TTRW se administraron como parte de NSAA.

- TTSTAND se realiza de forma rutinaria durante los exámenes clínicos estándar de pacientes con DMD. Se utilizó para evaluar el tiempo que tarda un paciente en pasar de estar acostado en el suelo a estar de pie. Se documentaron el número de segundos necesarios para realizar la prueba y la escala de calificación de 6 puntos de cómo el paciente alcanzó la posición de pie.

- Se utilizó TTRW para evaluar el tiempo (en segundos) que le tomó a un paciente correr/caminar 10 metros (incluida

una escala de calificación de 6 puntos para la calidad de la carrera/caminata).

[0152] **Estudio de Fase 2 de EE. UU./Canadá: Seguridad**

En cuanto a los datos de seguridad de 16 pacientes con DMD tratados con dosis altas y bajas de NS 065/NCNP-01 (Viltolarsen) (40 mg/kg/semana u 80 mg/kg/semana), no se plantearon preocupaciones importantes en la ejecución del estudio, calidad de los datos o seguridad de los participantes. Ningún participante interrumpió el tratamiento en el momento de las 48 semanas. Específicamente, no hubo TEAE (eventos adversos emergentes del tratamiento) que requirieran la interrupción o reducción de la dosis de NS 065/NCNP-01 (Viltolarsen). Todos los eventos adversos (EA) fueron leves o moderados.

[0153] **Ejemplo 3: Influencia del pH En La Estabilidad De Viltolarsen**

(A) Evaluación De La Estabilidad Del pH (1)

Para examinar la relación entre las propiedades líquidas de una solución y la estabilidad de Viltolarsen, se utilizó un tampón Britton-Robinson (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11)

para evaluar la estabilidad. de Viltolarsen en las soluciones que tienen varios valores de pH.

[0154] **Condiciones De La Prueba**

Concentración de solución de fármaco: Viltolarsen 2 mg/mL

Solución: tampón Britton-Robinson (pH 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11)

Condiciones de conservación: (1) a 121°C (tratado en autoclave) durante 10, 30 o 60 minutos; o (2) a 80°C en una incubadora durante 4 a 7 días

Criterios de valoración: apariencia (confirmación mediante observación visual), pH (medidor de pH), prueba de pureza (método HPLC), tasa de recuperación (tasa de supervivencia) (método HPLC)

Condiciones de HPLC:

Tasa de flujo: 1,0 ml/min

Detector: absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 264 nm)

Columna: Un tubo de acero inoxidable con un diámetro interior de 4,6 mm y una longitud de 15 cm, relleno con 3.5 µm de gel de sílice octadecilsililado para cromatografía líquida (Waters, X-bridge C18).

Temperatura de la columna: 60°C

Fase móvil:

- Se disolvieron 1.42 g de hidrogenofosfato disódico en aproximadamente 750 ml de agua y luego se añadió una solución acuosa de hidróxido de sodio para ajustar el valor de pH de la solución obtenida a pH 12.0. Posteriormente, se añadió agua a la solución para dar como resultado 1000 ml (solución P).

- Se adicionaron 300 mL de acetonitrilo a 700 mL de la solución P, y luego se disolvieron 16.12 g de bromuro de tetrabutilamonio en la solución obtenida (eluyentes A).

- Se añadieron 300 mL de acetonitrilo a 300 mL de la solución P, y luego se disolvieron 9.67 g de bromuro de tetrabutilamonio en la solución obtenida (eluyentes B).

- Alimentación líquida de las fases móviles: las fases móviles A/B se cambiaron de (100% vol/0% vol) a (0% vol/100% vol) durante 30 minutos.

En el presente ejemplo y los siguientes ejemplos, el porcentaje del área del pico principal de Viltolarsen (área del pico principal (%)) se muestra como un valor de la prueba de pureza, cuando una suma de las áreas de pico totales detectadas que comprenden impurezas se estableció en 100.

[0155] **Resultados De La Prueba**

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 10 y la Figura 5. "ST" significa una solución acuosa de Viltolarsen diluida con agua purificada en la misma concentración de

solución de fármaco, y se preparó con cada preparación (y no se conservó). Como resultado, se encontró que Viltolarsen era inestable en una solución en un rango ácido, pero era relativamente estable en una solución neutra a débilmente alcalina.

[0156] **Tabla 10 Resultados De La Evaluación De La Estabilidad De Viltolarsen En Tampón Britton-Robinson (pH 3 a 11)**

Periodo de Medición		Elemento de Medición	ST	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8	pH 9	pH 10	pH 11
Durante la preparación		Apariencia	-	Claro e incoloro	Claro e incoloro	Claro e incoloro	Claro e incoloro	Claro e incoloro	Claro e incoloro	Claro e incoloro	Claro e incoloro	Claro e incoloro
		pH	-	3.15	4.10	5.09	6.09	7.08	8.03	8.99	9.87	10.49
		Pureza: área pico principal (%)	86.53	85.94	86.75	86.81	86.70	86.58	86.74	85.99	86.56	86.34
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia) (%)	100	96.6	97.5	97.9	97.6	97.8	98.7	95.1	95.8	96.5
121° C	10 min	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		Pureza: área pico principal (%)	86.49	29.71	68.72	81.19	84.04	84.91	85.08	-	-	-
		Tasa de recuperación(tas	100	25.3	69.9	89.2	92.4	93.0	95.2	-	-	-

		a supervivencia) (%)										
	30 min	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		pH	-	3.51	4.16	5.08	-	-	-	-	-	-
		Pureza: área pico principal (%)	86.60	15.40	56.09	77.90	81.85	82.53	82.61	81.71	78.77	75.94
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia) (%)	100	10.6	57.5	85.1	91.0	91.1	92.4	92.2	87.9	85.2
	60 min	Apariencia	-	-	-	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		pH	-	-	-	-	6.13	7.10	8.10	9.04	9.87	10.33
		Pureza: área pico principal (%)	86.61	-	-	-	78.95	79.75	79.03	77.13	73.26	68.70
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia) (%)	100	-	-	-	84.9	85.5	85.7	83.4	77.9	72.4
80 °C	4 días	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		pH	-	3.51	4.16	5.08	-	-	-	-	-	-
		Pureza: área pico principal (%)	85.71	0.38	18.01	67.16	79.64	82.94	82.65	82.58	81.32	80.52
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia)	100	0.1	12.1	64.4	87.7	93.5	91.8	91.7	89.4	88.0

		(%)										
	7 días	Apariencia	-	-	-	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		pH	-	-	-	-	6.12	7.08	8.10	9.10	9.97	10.53
		Pureza: área pico principal (%)	85.06	-	-	-	71.42	77.43	79.75	77.54	76.48	70.71
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia) (%)	100	-	-	-	78.5	86.5	88.4	84.2	82.7	75.2

[0157] **(B) Evaluación De La Estabilidad Del pH (2)**

Para examinar más específicamente una región de pH en la que Viltolarsen es estable, se utilizó un tampón de bórax de fosfato de potasio (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 o 9.2) para evaluar la estabilidad de Viltolarsen en las soluciones. teniendo varios valores de pH (pH 6 a 9).

[0158] **Condiciones De La Prueba**

Concentración de solución de fármaco: Viltolarsen 2 mg/mL

Solución: tampón de fosfato de potasio-bórax (pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 o 9.2)

Condiciones de conservación: (1) a 121°C (tratado en autoclave) durante 10, 30 o 60 minutos; o (2) a 80°C en una incubadora durante 1, 4, 7 o 14 días

Criterios de valoración: apariencia (confirmación mediante observación visual), pH (medidor de pH), prueba de pureza (método HPLC), tasa de recuperación (tasa de supervivencia) (método HPLC)

Condiciones de HPLC:

Los mismos que los aplicados en el apartado (A) anterior, con la excepción de que la temperatura de la columna se fijó en 50°C.

[0159] **Resultados De La Prueba**

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 11 y la Figura 6. Como resultado, se encontró que Viltolarsen era más estable en una solución con pH de 7 a 7.5.

[0160] **Tabla 11 Resultados De La Evaluación De La Estabilidad De Viltolarsen En Tampón De Fosfato De Potasio-Bórax (pH 6 a 9)**

Periodo de Medición	Elemento de Medición	ST	pH 6	pH 6.5	pH 7	pH 7.5	pH 8	pH 8.5	pH 9	pH 9.2
Durante la preparación	Apariencia	–	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro
	pH	–	6.02	6.50	7.00	7.51	7.99	8.49	8.99	9.18
	Pureza: área pico principal (%)	86.49	85.80	85.87	85.70	86.07	85.73	85.73	85.77	85.81
	Tasa de recupe	100	98.0	98.7	97.5	97.4	98.8	98.5	98.4	99.3

		ración (tasa supervivencia) (%)									
121°C	10 min	Pureza: área pico principal (%)	86.07	82.44	83.91	84.74	84.27	83.90	83.87	82.99	82.90
		Tasa de recuperación (tasa supervivencia) (%)	100	93.9	95.2	96.7	95.4	95.4	93.5	93.4	95.2
	30 min	Pureza: área pico principal (%)	86.16	79.99	80.60	81.13	80.86	80.72	79.69	78.26	77.30
		Tasa de recuperación (tasa supervivencia) (%)	100	93.0	91.1	93.4	93.0	93.5	92.3	90.1	88.1
	60 min	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		pH	-	6.04	6.53	7.01	7.53	8.03	8.52	9.02	9.22
		Pureza: área pico principal (%)	85.69	76.22	77.33	77.59	77.47	76.79	75.71	73.03	71.42
		Tasa de recuperación (tasa supervivencia) (%)	100	85.5	88.5	88.1	87.0	86.5	85.1	81.1	80.4
80°	1 dí	Pureza: área pico	86.51	81.47	83.20	84.99	84.94	85.08	84.48	83.81	83.02

C	a	principal (%)									
		Tasa de recuperación (tasa supervivencia) (%)	100	92.5	95.0	96.4	96.7	97.6	96.8	96.0	93.6
	4 días	Pureza: área pico principal (%)	86.40	67.46	72.62	78.71	77.81	75.79	75.37	71.64	69.70
		Tasa de recuperación (tasa supervivencia) (%)	100	75.6	81.6	89.7	87.9	86.2	85.4	80.5	76.5
	7 días	Pureza: área pico principal (%)	86.12	59.16	62.98	73.62	74.22	70.30	67.95	66.52	60.86
		Tasa de recuperación (tasa supervivencia) (%)	100	64.1	72.4	83.0	83.1	78.8	74.8	74.0	66.7
	14 días	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		pH	-	6.06	6.54	7.03	7.54	8.03	8.52	9.02	9.21
		Pureza: área pico principal (%)	86.08	39.64	50.26	60.10	62.46	55.41	53.98	49.95	-
		Tasa de recuperación (tasa	100	40.4	54.2	62.5	68.4	58.9	57.7	50.3	-

		superv ivenci a) (%)									

[0161] **Ejemplo 4: Influencia Del Ajustador De Ph Sobre La Estabilidad De La Formulación**

El presente ejemplo está dirigido a seleccionar un ajustador de pH para ajustar la solución de inyección de Viltolarsen a un rango de pH estable (pH de 7 a 7.5). Se agregaron varios tipos de ajustadores de pH (KH_2PO_4 10 mM, Na2HPO4 10 mM, KH2PO4-Na2HPO4 10 mM o KH_2PO_4-Na_2HPO_4 100 mM) a una solución de Viltolarsen a 10 mg/ml, de modo que el pH de la solución de Viltolarsen se ajustara a un valor estable de pH. Posteriormente, se evaluó la estabilidad de las soluciones de Viltolarsen a 10 mg/ml.

[0162] **Condiciones De La Prueba**

Concentración de solución de fármaco: Viltolarsen 10 mg/mL

Prescripción de solución de fármaco: como se muestra en la siguiente Tabla 12

Condiciones de conservación: a 121°C (tratado en autoclave) durante 30 a 60 minutos

Criterios de valoración: apariencia (confirmación mediante observación visual), pH (medidor de pH), prueba de pureza (método HPLC), tasa de recuperación (tasa de supervivencia) (método HPLC)

[0163] **Tabla 12 Prescripción De Solución Farmacológica**

Ajustador de pH	Sin tampón (HCl/NaOH)	10 mM KH_2PO_4	10 mM Na_2HPO_4	10 mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4	100 mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4
Viltolarsen (mg)	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (mg)	9	9	9	9	9
Dihidrogenofosfato de potasio (mg)	-	1.36	-	0.27	2.72
Fosfato de hidrógeno disódico (mg)	-	-	1.42	1.14	11.36
0.1 mol/mL HCl	q.s.*	-	q.s.*	q.s.*	q.s.*
0.1 mol/ml de hidróxido de sodio	q.s.*	q.s.*	-	q.s.*	q.s.*
Agua para inyección	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Cantidad total (mL)	1	1	1	1	1

*: el valor de pH se ajusta a pH 7.3

[0164] **Resultados De La Prueba**

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 13 y la Figura 7. Como resultado, se encontró que, incluso sin usar tampones, Viltolarsen era estable a un nivel equivalente o mayor que el caso de usar un tampón de fosfato. En particular, sin usar tampones, Viltolarsen fue más estable que en un tampón de fosfato de alta concentración (KH_2PO_4-Na_2HPO_4 100 mM en el presente ejemplo).

[0165] **Tabla 13 Resultados Del Examen De Ajustadores De pH**

Periodo de Medición		Elemento de Medición	ST	Sin tampón	10mM KH_2PO_4	10mM Na_2HPO_4	10mM KH_2PO_4 Na_2HPO_4	100mM KH_2PO_4 Na_2HPO_4
Durante la preparación		Apariencia	-	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro	Transparente e incoloro
		pH	-	7.32	7.32	7.33	7.30	7.32
		Pureza: área pico principal (%)	86.52	86.17	85.95	85.98	86.15	86.07
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia) (%)	100	100.0	98.7	98.9	98.8	99.0
121 °C	10 min	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		Pureza: área pico principal (%)	85.79	84.78	84.47	84.41	84.30	84.01
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia) (%)	100	96.7	96.7	97.3	97.1	95.7
	30 min	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		Pureza: área pico principal (%)	86.52	83.41	83.35	83.42	83.57	82.57
		Tasa de recuperación(tasa supervivencia) (%)	100	94.5	94.0	94.4	94.5	90.3
	60 min	Apariencia	-	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio	Sin cambio
		pH	-	7.26	7.27	7.28	7.26	7.23
		Pureza: área pico principal (%)	85.79	80.81	79.72	79.67	79.63	78.07
		Tasa de recuperación(tasa superviven	100	92.3	89.5	91.2	91.1	87.5

		cia) (%)						

[0166] **Ejemplo 5: Relación Entre Tampón Y Generación De Multímeros**

Viltolarsen puede generar multímeros dependiendo de las condiciones de conservación y, por lo tanto, puede disminuir la pureza de los monómeros. En el presente ejemplo, se añadió cloruro de sodio al 0.9% como agente de tonicidad a una solución de fármaco de Viltolarsen de 50 mg/ml y, a continuación, se le añadieron además varios tipos de tampones. A partir de entonces, se midió la generación de multímeros.

[0167] **Condiciones De La Prueba**

Concentración de solución de fármaco: Viltolarsen 50 mg/mL

Condiciones de conservación: a 60°C en incubadora durante 5 días

Criterios de valoración: multímeros (método HPLC, columna SEC)

Condiciones De Análisis:

Detector: Absorciómetro ultravioleta (longitud de onda de medición: 260 nm)

Columna: Se llenó un tubo de acero inoxidable con un diámetro interior de 7.8 mm y una longitud de 30 cm con 7 µm

de gel de polímero de vinilo a base de estireno para cromatografía líquida; y dos de tales columnas se conectaron en serie (TSK gel G3000 PWXL, 7 µm, 7.8 mm x 30 cm, Tosoh Corporation).

Temperatura de la columna: 25°C

Fase móvil: se disolvieron 15,6 g de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado en 750 ml de agua y luego se añadió una solución de muestra de hidróxido de sodio para ajustar el valor de pH de la solución a pH 7,3. Luego, se añadió agua a la solución para dar como resultado 1000 ml. Posteriormente, se añadieron 200 ml de acetonitrilo a 800 ml de la solución obtenida.

Tasa de flujo: se ajustó la tasa de flujo, de modo que el tiempo de retención de los monómeros de Viltolarsen fuera de aproximadamente 21 minutos.

Rango de medición del área: hasta el pico de los monómeros de Viltolarsen

[0168] **Resultados De La Prueba**

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 14. Como resultado, se encontró que la generación de multímeros aumentó mediante la adición de un tampón de fosfato 50 mM (dihidrogenofosfato de sodio dihidrato-hidrogenofosfato disódico: $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$-Na_2HPO_4) o un tampón de citrato (citrato trisódico dihidrato).

[0169] **Tabla 14 Resultados De La Evaluación De Multímeros (Conservados A 60°C)**

Tampón	Concentración de tampón (mM)	Cloruro de Sodio (mM)	Cantidad de Multímeros (RRT 0.95)			
			Valor Inicial	1d	2d	5d
Sin Tampón		150	N.D.	N.D.	N.D.	0.15
Citrato	10	150	N.D.	N.D.	0.12	0.14
	50	150	N.D.	N.D.	0.13	0.16
Tris	10	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.14
	50	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.13
Fosfato	10	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.14
	50	150	N.D.	N.D.	N.D.	0.20

[0170] **Ejemplo 6: Estudios de Solubilidad (100 mg/mL)**

Se estudió un aumento en la concentración de una solución inyectable.

[0171] **Condiciones De La Prueba**

Solución farmacológica: los 2 tipos siguientes

[0172] **Tabla 15 Solución Farmacológica (2 Tipos)**

Concentración Fármaco Principal	100 mg/mL	
Ajustador de pH	**Sin tampón (HCl, NaOH)**	**10mM KH_2PO_4-Na_2HPO_4**
Viltolarsen (mg)	100	100
NaCl (mg)	9	9
KH2PO4 (mg)	–	0.27
Na2HPO4 (mg)	–	1.14
HCl 0,1 N	q.s.*	q.s.*
NaOH 0,1 N	q.s.*	q.s.*
Agua para inyección	q.s.	q.s.
Cantidad total (mL)	1	1

*: el valor de pH se ajusta a pH 7.3

Filtro de filtración: fabricado en PVDF (Millex GV, 0.22 µm, 33 mm, Millipore).

Criterios de valoración: apariencia (confirmación mediante observación visual), pH (medidor de pH), prueba de pureza (método HPLC), tasa de recuperación después de la filtración (método HPLC).

[0173] **Resultados De La Prueba**

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 16. Se preparó una solución inyectable de Viltolarsen de 100 mg/ml. La solución inyectable de Viltolarsen preparada no tuvo problemas de solubilidad o filtración utilizando un filtro esterilizado, y era una solución transparente e incolora. Después de la conservación de la solución en un lugar frío, la solución se volvió viscosa, pero no hubo cambios en la apariencia. A partir de estos resultados, se encontró que es posible preparar una solución inyectable de 100 mg/ml.

[0174] **Tabla 16 Resultados Del Examen De Solución Inyectable De Alta Concentración**

Solución del Fármaco	Elementos de Medición	Antes de la filtración	Después de la filtración(PVDF)
100 mg/mL, Sin tampón	Apariencia	Transparente e incoloro	Sin cambio
	pH	7.28	7.25
	Pureza: Área pico principal (%)	93.31	93.52
	Tasa recuperación (%)	100.0	99.0

100 mg/mL, 10 mM tampón de fosfato	Apariencia	Transparente e incoloro	Sin cambio
	pH	7.28	7.28
	Pureza: Área pico principal (%)	93.28	93.33
	Tasa recuperación (%)	100.0	98.9

[0175] **[Ejemplo 7] Estudios de Solubilidad (50 mg/mL)**

Se evaluó la solubilidad de una solución de fármaco de 50 mg/ml. Se preparó una solución de fármaco y se evaluó la solubilidad de la misma y la filtración usando un filtro esterilizado.

[0176] **Condiciones De La Prueba**

Solución farmacológica:

[0177] **Tabla 17**

Concentración del Fármaco Principal	**50 mg/mL**
Ajustador pH	Sin tampón (HCl, NaOH)
Viltolarsen (g)	1300
NaCl (g)	234
0.1 N HCl	q.s.*
0.1 N NaOH	q.s.*
Agua para inyección	q.s.
Cantidad total (L)	26

*: el valor de pH se ajusta a pH 7.3

Filtro de filtración: hecho de PVDF (filtro de cartucho Millidisk, 0.22 µm, MCGL40S03/uno + MCGL40S03/dos, Merck)

Criterios de valoración: apariencia (confirmación mediante observación visual), pH (medidor de pH), prueba de pureza (método HPLC), cuantificación (método HPLC)

[0178] **Resultados De La Prueba**

Los resultados de la prueba se muestran en la Tabla 18. Como resultado, la solución de fármaco de 50 mg/ml se convirtió en una solución transparente e incolora, y no hubo cambios en el contenido entre antes y después de la filtración. A partir de estos resultados, se descubrió que es posible preparar una solución inyectable de 50 mg/ml y que no hay problemas con respecto a la ampliación.

[0179] **Tabla 18 Resultados De La Evaluación**

Elemento de Prueba		Antes de la filtración	Después de la filtración
Apariencia		Solución transparente e incolora	Solución transparente e incolora
pH		7.3	7.4
Prueba de pureza (sustancias relacionadas)	RRT = 0.80	0.22%	0.22%
	RRT = 0.85	1.74%	1.74%
	RRT = 0.91	0.72%	0.70%
	RRT = 1.07	2.09%	1.99%
	RRT = 1.24	0.31%	0.30%
	Otros individuos	0.13%	0.12%
	Total de Sustancias Relacionadas	5.39%	5.26%
Cuantificación		100.9%	100.8%

[0180] En los siguientes Ejemplos 8 a 10, se llevaron a cabo pruebas con respecto a muestras obtenidas de los

pacientes que habían participado en el ensayo clínico del Ejemplo 2 o de los propios pacientes que habían participado en el ensayo clínico del Ejemplo 2.

Ejemplo 8

Cuantificación De La Proteína Distrofina Según Espectrometría De Masas

(Metodos experimentales)

Esquema: método de análisis biológico

La muestra se sometió a electroforesis en SDS-PAGE para separar una proteína, y la proteína separada se sometió luego a digestión en gel usando tripsina para obtener fragmentos de péptidos. Los fragmentos de péptidos se extrajeron de la sección de gel y luego se secaron. A continuación, los péptidos se volvieron a disolver y, a continuación, se llevó a cabo la identificación y cuantificación de una proteína distrofina mediante HPLC-MS/MS usando una columna de fase inversa. Cuando la cantidad de proteína distrofina en un control normal se estableció en 100%, el rango de una curva de calibración fue de 1% a 25%. La concentración se calculó a partir de una relación de área de pico, utilizando filamina C como proteína estandarizada. Para la ecuación de regresión se aplicó un método de mínimos cuadrados y se obtuvo la ecuación: $y= mx + b$ (y: relación de área de pico, x: % de distrofina).

[0181] **Digestión En Gel**

La muestra a medir por análisis LC-MS/MS se obtuvo separando una proteína por SDS-PAGE (SDS: dodecil sulfato de sodio, PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida), según el peso molecular, y sometiendo la proteína separada a digestión en gel. Cada gel estaba compuesto por un total de 11 muestras, a saber, analitos que constituyen una curva estándar (distrofinas al 0.0%, 1.0%, 3.0%, 10.0% y 25.0%), 12.5 µg de una proteína (SILAC) extraída de células humanas de miotubo a las que se han añadido aminoácidos marcados con isótopos estables y que posteriormente se han cultivado (SILAC), uno en blanco y 4 muestras de ensayo clínico. Había 12 carriles para el gel y el carril restante se utilizó para un marcador de peso molecular. El Analito se produjo mezclando extractos de proteínas de 5 tipos de biopsia de músculo sin DMD y 2 tipos de biopsia de músculo con DMD entre sí. La biopsia de músculo DMD se adquirió de la Universidad de Binghamton y se completó la revisión ética de la misma. Antes de realizar el presente ejemplo, la cantidad de distrofina en cada biopsia de músculo se había medido previamente mediante Western Blot. Usando un dispositivo de preparación de criosección, se obtuvieron 70 cortes de secciones seriadas cada una con un grosor de 10 µm de la biopsia muscular. La sección de músculo se transfirió a un microtubo que se había enfriado

previamente en hielo seco. Utilizando tampón RIPA que comprende el inhibidor de proteasa/fosfatasa de Thermo Scientific, se extrajo una proteína de la sección de músculo. La concentración de proteína en el extracto se cuantificó usando el kit de ensayo de proteína BCA (Pierce). Cada muestra a someter a electroforesis contenía 50 µg de una proteína y se preparó añadiendo 12.5 µg de SILAC. Al Analito y a la muestra clínica se le añadió un extracto de SILAC como patrón interno para la obtención del% de distrofina. Usando gel NuPAGE 3-8% Tris-Acetato, se llevó a cabo la electroforesis a 150 V durante 75 minutos. La electroforesis en gel se realizó por duplicado, utilizando dos geles (gel A y gel B) con respecto a una sola muestra. El gel sometido a electroforesis se inmovilizó usando metanol:agua:ácido acético (50:45:5) durante 30 minutos, seguido de intercambio con agua, y luego se llevó a cabo la rehidratación dos veces. A continuación, se llevó a cabo la tinción con azul de Coomassie durante 1 hora. La decoloración del gel se llevó a cabo a 4°C durante la noche. Se seccionó el gel, en el que estaba presente una proteína distrofina en el intervalo de 460 kDa a 268 kDa según el marcador de peso molecular, y luego se lavó con agua:acetonitrilo (50:50) dos veces. La digestión en gel se realizó usando tripsina (grado de espectrometría de masas Gold, Promega Corporation) para

obtener fragmentos de péptidos, y los fragmentos de péptidos obtenidos se secaron luego mediante centrifugación al vacío. Los fragmentos de péptidos de distrofina se conservaron a -80°C y luego se usaron en un análisis de acuerdo con Q Exactive Nano-LC-MS/MS.

[0182] **Muestra De La Prueba**

Dieciséis pacientes participaron en el ensayo clínico. Se obtuvieron muestras de biopsia muscular de cada uno de los 16 pacientes antes y después de la administración. Se obtuvieron sesenta y cuatro muestras de 32 especímenes como resultado de la duplicación y luego se analizaron. Además, dado que se sometieron a un re análisis 8 muestras obtenidas de 4 especímenes como resultado de la duplicación, se analizaron un total de 72 muestras.

[0183] **Análisis Según LC-MS/MS**

Los fragmentos peptídicos obtenidos se analizaron mediante un método de espectrometría de masas de cromatografía líquida (LC-MS/MS), en el que se combinó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución, Dionex Ultimate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) con un dispositivo de espectrometría de masas, Q Exactive Plus (HRMS: espectrómetro de masas de alta resolución) (Thermo Fisher Scientific).

Los fragmentos de péptidos secos se redisolvieron en acetonitrilo (ACN) al 2% + ácido trifluoroacético (TFA) al

0.1%. Para la introducción de la muestra en LC-MS/MS, se utilizó un bucle de inyección de 5 µL, bucle de muestra Dinoex nanoViper (Thermo Fisher Scientific).

[0184] La cromatografía líquida se llevó a cabo en las siguientes condiciones.

Columna de análisis: columna de fase inversa, Acclaim Pepmap RSLC C18, 15 cm x 75 µm, tamaño de partícula: 3 µm, EASY SPRAY (Thermo Fisher).

Temperatura de la columna analítica: 50°C

Fases móviles A: ácido fórmico al 1% (HCOOH); Fases móviles B: ácido fórmico al 0.1% en ACN

Tasa de flujo: 0.500 µL/min (NC)

Modo de inyección de muestra: bucle parcial (tamaño del bucle: 5 µL)

Cantidad de inyección de muestra: 1.00 – 4.00 µL

Temperatura del inyector automático: 10°C

Tiempo de ejecución: 40.00 minutos

[0185] **Tabla 19 Configuración De Gradiente De Bomba NC**

Tiempo(min)	Tasa de Flujo	% Fase Móvil A	% Fase Móvil B
0.00	0.500	99.0	1.0
6.50	0.500	99.0	1.0
26.50	0.500	65.0	35.0
26.60	0.500	10.0	90.0
29.00	0.500	10.0	90.0
29.10	0.500	99.0	1.0
40.00	0.500	99.0	1.0

[0186] El dispositivo de espectrometría de masas se utilizó en las siguientes condiciones:

Fuente de iones: Thermo Fisher EASY-Spray

Modo iónico: catión

Escaneo: monitoreo de reacciones en paralelo

Ancho de pico cromado (ancho completo a la mitad del máximo): 10 segundos

Tiempo de ciclo total mínimo: 40 minutos

Resolución: 17,500

Objetivo de control de ganancia automático: 1e5

Tiempo máximo de inyección de muestra: 50 milisegundos

Ancho de separación del espectrómetro de masas cuadrupolo: unidad de 1.0 m/z

Datos del espectro: perfil

Tolerancia de masa: 10 ppm

Parámetros ajustables típicos (archivo de sintonización de distrofina)

Voltaje de pulverización: 1.8 kV

Temperatura capilar: 275°C

Nivel RF de lente S: 70

[0187] **Tabla 20 Lista De Selección De Masa**

ID Péptido	Secuencia Péptido	Masa (m/z)	Número de Carga (z)	Tiempo de Retención: Inicio (min)	Tiempo de Retención: Parada (min)
DYST_2	IFLTEQPLEGLEK	758.9165	2	18.80	20.40

DYST_2_IS	IFLTEQPLEGLE **K^**	762.9236	2	18.80	20.40
FilC_1	VAVGQEQAFSVNTR	753.3890	2	15.40	17.40
FilC_1_IS	VAVGQEQAFSVNT **R^**	756.3990	2	15.40	17.40
FilC_2	SPFVVNVAPPLDLSK	791.9456	2	20.30	22.20
FilC_2_IS	SPFVVNVAPPLDLS **K^**	795.9527	2	20.30	22.20

K^ = Lys (^{13}C6, ^{15}N2); **R^** = Arg (^{13}C6, ^{15}N4) – aminoácidos marcados con isótopos

[0188] **Tabla 21 Tiempo de Retención Predicho**

ID Péptido	Tiempo de Retención (min)
DYST_2	19.95
DYST_2_IS	19.95
FilC_1	16.24
FilC_1_IS	16.24
FilC_2	20.68
FilC_2_IS	20.68

El tiempo de retención cambia dentro del rango de ±1.5 minutos.

[0189] **Tabla 22 Orden De Inyección De Muestras Sometidas A Electroforesis Con El Mismo Gel En LC-MS/MS**

Orden	Muestra
1	Muestra excluída del análisis
2	Muestra excluída del análisis
3	En blanco
4	En blanco
5	SILAC
6	Analito distrofina 0%
7	Analito distrofina 1%
8	Analito distrofina 3%
9	Analito distrofina 10%
10	Analito distrofina 25%
11	Muestra excluída del análisis
12	Muestra clínica 1
13	Muestra excluída del análisis
14	Muestra clínica 2

15	Muestra excluída del análisis
16	Muestra clínica 3
17	Muestra excluída del análisis
18	Muestra clínica 4

Muestra excluida del análisis: SILAC diluida con las de en blanco.

[0190] Utilizando LC Quan versión 3.0 fabricada por Thermo Scientific, se recopilaron datos del cromatograma. La tolerancia de masa se estableció en 20 ppm y el algoritmo de integración se estableció en ICIS. Cuando el área del pico de distrofina en el Analito 1% u otros Analitos fue de 10,000 o menos, se prestó atención a lo siguiente. Es decir, se confirmó que, tanto en distrofina como en filamina C, la relación de área de pico entre los péptidos obtenidos y los péptidos marcados es un valor numérico confiable, que no altera el porcentaje de distrofina, en comparación con el analito 0%.

El área de los picos de distrofina y la de la filamina C se calcularon sumando las áreas de los picos correspondientes a los iones del producto. El área del pico de distrofina se obtuvo a partir de un tipo de fragmento peptídico de distrofina (es decir, secuencia de aminoácidos DYST2: IFLTEQPLEGLEK (SEQ ID NO: 4)). El área del pico de filamina C se estableció como un valor promedio de dos tipos de fragmentos peptídicos de filamina C (es decir, secuencia de

aminoácidos FILC1: VAVGQEQAFSVNTR (SEC ID NO: 6) y secuencia de aminoácidos FILC2: SPFVVNVAPPLDLSK (SEC ID NO: 8)).

[0191] **Tabla 23**

Distrofina	**Secuencia del Péptido**	**MS1 (m/z)**	**Ion del Producto**
DYST_2	IFLTEQPLEGLEK (SEQ ID NO: 4)	758.9165	785.4387, 1042.5400, 1143.5870, 1256.6697
DYST_2_IS	IFLTEQPLEGLE**K^**	762.9236	793.4521, 1050.5500, 1151.5932, 1264.6708
Filamina C	Secuencia del Péptido	MS1 (m/z)	Ion del Producto
FilC_1	VAVGQEQAFSVNTR (SEQ ID NO: 5)	753.3890	723.3784, 794.4155, 922.4741, 1051.5167
FilC_1_IS	VAVGQEQAFSVNT**R^**	756.3990	729.3985, 800.4356, 928.4942, 1057.5368
FilC_2	SPFVVNVAPPLDLSK (SEQ ID NO: 6)	791.9456	769.4454, 840.4825, 1053.5938, 1152.6623
FilC_2_IS	SPFVVNVAPPLDLS**K^**	795.9527	777.4596, 848.4974, 1061.6081, 1160.6765

[0192] El nivel de proteína distrofina (la relación de área de pico entre distrofina y filamina C) en los Analitos y las muestras clínicas individuales se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación. Dado que se detectó distrofina incluso en el analito 0%, la corrección se realizó restando el valor numérico del nivel de proteína distrofina en el analito 0% del valor numérico del nivel de proteína distrofina en cada analito. Utilizando la plantilla de Excel, se obtuvo la línea de regresión de los valores numéricos del porcentaje de distrofina y niveles de proteína distrofina de los analitos para cada gel, y luego se obtuvo el porcentaje de distrofina

en muestras clínicas a partir de los valores numéricos de los niveles de proteína distrofina en las muestras clínicas.

Ecuación 1

$$\text{Nivel proteína distrofina} = \frac{\text{Tasa distrofina}}{\text{Tasa Filamina C}} = \frac{\text{Distrofina de cada muestra / Distrofina de la forma marcada con SILAC}}{\text{Filamina C de cada muestra / Filamina C de la forma marcada con SILAC}}$$

[0193] **Tabla 24**

<table>
<tr><th></th><th colspan="2">LCcuan</th><th colspan="2">Excel</th></tr>
<tr><td>1</td><td>DYST_2 área del pico</td><td rowspan="2">Calcular la relación entre el área del pico de Dist 2 y el área del pico marcada con Dist 2</td><td rowspan="2">Relación entre el área del pico de Dist 2 y el área del pico marcada con Dist 2</td><td rowspan="6">% Distrofina (Calculado a partir del valor numérico del nivel de proteína distrofina obtenido al dividir la relación entre Dist 2 y el área del pico marcada con Dist 2 por la relación entre FilC y el área del pico marcada con FilC, y la línea de regresión del % de distrofina de analitos)</td></tr>
<tr><td>2</td><td>DYST_2_IS área del pico</td></tr>
<tr><td>3</td><td>FilC_1 área del pico</td><td rowspan="2">Calcular la relación entre el área del pico de FilC 1 y el área del pico marcada con FilC 1</td><td rowspan="4">Relación entre el área del pico de FilC y el área del pico marcada con FilC (valor medio de los dos valores de restantes)</td></tr>
<tr><td>4</td><td>FilC_1_IS área del pico</td></tr>
<tr><td>5</td><td>FilC_2 área del pico</td><td rowspan="2">Calcular la relación entre el área del pico de FilC 2 y el área del pico marcada con FilC 2</td></tr>
<tr><td>6</td><td>FilC_2_IS área del pico</td></tr>
</table>

[0194] **Resultados**

Se determinó que el porcentaje de distrofina en las muestras individuales analizadas era aceptado o no de acuerdo con los criterios de aceptación predeterminados. Entre las 72 muestras medidas, 60 muestras cumplieron los criterios. Los

resultados de la medición se muestran en las Tablas 25 y 26. Se analizaron muestras individuales utilizando muestras duplicadas. Sin embargo, con respecto a 4 muestras obtenidas de dos pacientes en el grupo de dosis de 40 mg/kg (pacientes E y F en la Tabla 25) antes y después de la administración, dado que una muestra (gel B) no cumplía los criterios, el valor medido fue sólo uno de la otra muestra (gel A). Es decir, en el grupo de dosis de 40 mg/kg, entre 16 muestras de 8 especímenes antes de la administración, se pudieron medir 14 muestras. Una muestra mostró un 1% de distrofina y se midió que 11 muestras estaban por debajo del límite inferior de cuantificación. Además, entre 16 muestras de 8 especímenes en la semana 25, se pudieron medir 14 muestras. Se midió que una muestra estaba por debajo del límite inferior de cuantificación para ambas mediciones. Aparte de esto, se detectó 1% o más de distrofina.

En el caso del grupo de dosis de 80 mg/kg, se midió que todas las 16 muestras de 8 muestras antes de la administración estaban por debajo del límite inferior de cuantificación. Además, en todas las 16 muestras de 8 muestras en la semana 25, se detectó distrofina a un nivel por encima del límite de cuantificación, y la cantidad detectada fue del 4.2% en promedio.

A partir de los resultados anteriores, se confirmó que la expresión de una proteína distrofina se recupera mediante la administración de Viltolarsen a dosis de 40 mg/kg y 80 mg/kg.

[0195] **Tabla 25 Concentraciones De Proteína Distrofina En Extractos De Muestras De Ensayos Clínicos De Biopsias De Músculo Humano Calculadas Con DIST_2**

• Cohorte 1 (grupo de dosis de 40 mg/kg)

Pacientes a ser evaluados	Fecha de Visita	% Distrofina (Gel A)	% Distrofina (Gel B)
Paciente A	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente A	Semana 25	2.9	2.2
Paciente B	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente B	Semana 25	2.4	2.1
Paciente C	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente C	Semana 25	2.2	1.5
Paciente D	Antes de la administración	1.0	BLQ
Paciente D	Semana 25	3.2	3.4
Paciente E	Antes de la administración	BLQ	NR
Paciente E	Semana 25	1.3	NR
Paciente F	Antes de la administración	BLQ	NR
Paciente F	Semana 25	3.3	NR
Paciente G	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente G	Semana 25	2.1	1.8
Paciente H	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente H	Semana 25	BLQ	BLQ

NR: Imposible describirlo en informes. (Dado que el área del pico de distrofina se obtuvo solo en dos analitos, no cumplió con los criterios de aprobación de la inspección).

BLQ: por debajo del límite inferior (1%) de cuantificación

[0196] **Tabla 26 Concentraciones De Proteína Distrofina En Extractos De Muestras De Ensayos Clínicos De Biopsias De Músculo Humano Calculadas Con DIST_2**

• Cohorte 2 (grupo de dosis de 80 mg/kg)

Pacientes a ser evaluados	Fecha de Visita	% Distrofina (Gel A)	% Distrofina (Gel B)
Paciente I	Antes de la administración	BLQ	BLQ*
Paciente I	Semana 25	4.5	3.8
Paciente J	Antes de la administración	BLQ	BLQ*
Paciente J	Semana 25	1.8	3.5
Paciente K	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente K	Semana 25	2.2	2.6
Paciente L	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente L	Semana 25	1.1	2.2
Paciente M	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente M	Semana 25	1.3	1.3
Paciente N	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente N	Semana 25	12.2	9.3
Paciente O	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente O	Semana 25	10.2	8.6
Paciente P	Antes de la administración	BLQ	BLQ
Paciente P	Semana 25	1.6	1.3

BLQ: por debajo del límite inferior (1%) de cuantificación

*: Dado que el valor del área de pico del analito distrofina 1% era bajo, el límite inferior de cuantificación se convirtió en menos del 3%.

[0197] **Ejemplo 9**

Prueba De Función Motora (En La Semana 13 Y En La Semana 25 (Transcurrieron 12 Y 24 Semanas Desde La Administración Inicial)

(Método experimental)

La función motora del presente grupo de fármacos se evaluó comparándolo con un grupo de historia natural utilizado como control. El grupo de historia natural se seleccionó en función de los datos iniciales, de la investigación denominada estudio de historia natural de Duchenne (CINRG DNHS) realizada por un grupo cooperativo internacional de investigación neuromuscular (CINRG) que es una red de ensayos clínicos de distrofia muscular de EE. UU.

CINRG DNHS es un estudio longitudinal de historia natural, en el que se siguió como objetivos a cada uno de 440 pacientes varones con DMD durante un período de años, se recopilaron datos de los años 2006 a 2016 y se determinó que los pacientes acudían al hospital en el momento de línea de base, cuatro veces en el primer año, dos veces en el segundo año y luego, una vez al año, durante el período máximo de 10 años. En cada visita al hospital, los pacientes fueron sometidos a una prueba de función cronometrada, una prueba de fuerza muscular, una prueba de función por cuestionario, una prueba de función pulmonar y evaluación de la calidad de

vida. El ensayo 201 se llevó a cabo en instalaciones pertenecientes al CINRG, y los procedimientos operativos estándar (SOP) y los protocolos de formación del evaluador clínico se emparejaron entre ambas pruebas.

[0198] Como control del presente estudio, los pacientes que cumplieron con los siguientes criterios, incluidos los principales criterios de registro, como la edad, el estado del uso de esteroides y el área para el ensayo 201, fueron seleccionados de CINRG DNHS.

- Tener datos de pruebas de funcionamiento cronometradas durante al menos 12 meses [se requerían datos de tiempo para estar de pie (TTSTAND), tiempo para subir 4 escaleras (TTCLIMB) y tiempo para correr/caminar 10 metros (TTRW) en la línea de base].

- Pacientes entre 4 y <10 años al inicio del estudio.

- Región geográfica: América del Norte (EE. UU. Y Canadá).

- Administración de corticosteroides durante al menos 3 meses y uso continuo de corticosteroides durante el período de observación de 12 a 24 meses.

- Pacientes no registrados simultáneamente en otros estudios clínicos con respecto a otros agentes de omisión de exón.

- Los pacientes cumplen los siguientes criterios de

elegibilidad genética.

Criterios De Inclusión:

- Pacientes con resultados de pruebas genéticas

- Pacientes con mutación por duplicación

- Pacientes que tienen una mutación sin sentido o una mutación diminuta que causa un cambio de marco.

Criterios de Exclusión:

- Pacientes con mutación entre el promotor y el exón 8 (Estos pacientes fueron excluidos porque se informó que tenían una progresión lenta de la enfermedad ((1) Hum Mutat.2018; 39: 1193-1202 y (2) Hum Mutat.2008; 29(5):728-37).

- Pacientes susceptibles de recibir un tratamiento con omisión del exón 44 (estos pacientes fueron excluidos porque se informó que tenían una progresión lenta de la enfermedad ((1) Hum Mutat.2018; 39: 1193-1202.)

- Pacientes con mutación en estructura.

[0199] En consecuencia, 65 pacientes varones con DMD cumplieron los criterios descritos anteriormente. Entre los pacientes, 9 pacientes con DMD eran susceptibles de un tratamiento que implicaba la omisión del exón 53 (grupo de omisión del exón 53) y 56 pacientes con DMD no eran susceptibles de un tratamiento que involucraba la omisión del exón 53 (grupo de omisión sin exón 53).

[0200] **Tabla 27 Parámetros Del Grupo Administrado Por Viltolarsen Y Del Grupo De Control De Historia Natural (DNHS) Del CINRG**

Parámetros	***Viltolarsen n = 16***	***Omisión DNHS Exón 53 n = 9***	***Sin Omisión DNHS Exón 53 n = 56***	***Total DNHS n = 65***
Edad (años) Valor promedio (min. – max.)	7.4 (4.3 – 9.8)	6.3 (4.5 – 7.8)	7.2 (4.2 – 9.6)	7.1 (4.2 – 9.6)
Peso corporal (kg) Valor promedio (min. – max.)	23.0 (14.9 – 35.4)	21.6 (16.6 – 28.1)	24.4 (14.8 – 38.7)	24.0 (14.8 – 38.7)
Tipo de mutación, n (%)				
- susceptible a omisión del tratamiento del exón 53				
Eliminación de un solo exón	16 (100)	9 (100)	0	9 (13.8)
Múltiples eliminaciones de exones	0	3 (33.3)	0	3 (4.6)
- no susceptible de omisión del tratamiento del exón 53	16 (100)	6 (66.7)	0	6 (9.2)
Eliminación de un solo exón	0	0	56 (100)	56 (86.2)
Múltiples eliminaciones de exones	0	0	4 (7.1)	4 (6.2)
Duplicación de un solo exón	0	0	30 (53.6)	30 (46.2)
Múltiples duplicaciones de exones	0	0	3 (5.4)	3 (4.6)
Mutación de minuto	0	0	3 (5.4)	3 (4.6)
	0	0	16 (28.6)	16 (24.6)

[0201] **Resultados**

Cambios en las pruebas de función cronometradas [es decir, prueba de caminata de 6 minutos (6MWT), velocidad con

respecto al tiempo para estar de pie (TTSTAND), velocidad con respecto al tiempo para subir 4 escaleras (TTCLIMB) y velocidad con respecto al tiempo para correr/caminar 10 metros (TTRW)] y North Star Ambulatory Assessment (NSAA) en la semana 13 y en la semana 25 antes de la administración o desde el inicio se compararon entre 16 sujetos tratados con Viltolarsen (grupo administrado por Viltolarsen) y 65 pacientes en el grupo de historia natural de CINRG DNHS (grupo DNHS).

En el método de análisis aplicado en el presente ejemplo, el "valor antes de la administración" o la línea de base se estableció como una covariable que es un factor de fondo que influye en los resultados, los datos obtenidos en la Semana 13 y en la Semana 25 se usaron como valores repetidamente. medido a partir de sujetos específicos (medidas repetidas), y se llevó a cabo el análisis MMRM. Como resultado, el grupo al que se administró Viltolarsen del presente ejemplo mejoró significativamente en términos de distancia de caminata de 6 minutos y la velocidad con respecto al tiempo para correr/caminar 10 metros. Además, el grupo de fármacos actual mejoró en lugar del grupo de historia natural incluso en términos de todas las demás pruebas de función motora.

[0202] La Figura 8 incluye gráficos que muestran cambios

en los resultados de las pruebas de función motora individual del grupo administrado de Viltolarsen y el grupo de control de historia natural (DNHS) de CINRG en la semana 13 de administración (transcurrieron 12 semanas desde la administración inicial) y en la semana 25 de administración (pasaron 24 semanas). desde la administración inicial) de cada línea de base. La cantidad modificada indica un mínimo cuadrático medio de una cantidad en la Semana 13 o en la Semana 25 cambiada con respecto al valor inicial, la barra de error indica la desviación estándar y el valor P se calculó usando MMRM.

[0203] El número de muestras del grupo administrado por Viltolarsen y el del grupo de DNHS en puntos de tiempo individuales fue el siguiente.

Tabla 28

Grupo administrado por Viltolarsen	**Línea de Base**	**Semana 13**	**Semana 25**
Prueba de marcha de 6 minutos	16	15	15
Evaluación ambulatoria de North Star	16	15	16
Hora de pararse	16	16	16
Hora de subir 4 escalones	16	16	16
Tiempo para correr /caminar 10 metros	16	16	16

[0204] **Tabla 29**

DNHS	**Línea de Base**	**Semana 13**	**Semana 25**
Prueba de marcha	21	12	13

de 6 minutos			
Evaluación ambulatoria de North Star	22	11	15
Hora de pararse	65	39	42
Hora de subir 4 escalones	65	40	42
Tiempo para correr /caminar 10 metros	65	40	43

[0205] **Ejemplo 10**

Pruebas De Función Motora (En La Semana 85 (Pasaron 84 Semanas Desde La Administración Inicial))

(Método experimental)

Con respecto a las pruebas de funcionamiento cronometradas [es decir, prueba de caminata de 6 minutos (6MWT), tiempo para pararse (TTSTAND), tiempo para subir 4 escaleras (TTCLIMB) y tiempo para correr/caminar 10 metros (TTRW)] y Evaluación Ambulatoria North Star (NSAA), la medición se llevó a cabo 1 semana antes de la administración inicial y cada punto de tiempo en el que cada 12 semanas transcurrieron desde la administración inicial (semana 1) (es decir, en puntos de tiempo de las semanas 13, 25, 37, 49, 61, 73 y 85). El ensayo 201 se llevó a cabo en instalaciones pertenecientes al CINRG, y las pruebas de función motora se realizaron de acuerdo con los procedimientos operativos estándar (SOP) y los protocolos de formación de evaluadores clínicos utilizados en CINRG DNHS. Dado que los sujetos eran niños, algunos elementos no se pudieron realizar en algunas pruebas

porque, por ejemplo, los sujetos no se mantuvieron interesados en la implementación de las pruebas.

[0206] **Resultados**

Los resultados se muestran en la Figura 9 a la Figura 16. En la Evaluación Ambulatoria North Star, muchos pacientes con 5 o más años en el grupo administrado por Viltolarsen mantuvieron o mejoraron sus puntajes. Según la publicación sobre estudios, en los que se establecieron criterios de entrada de pacientes como los de los estudios clínicos a partir de los datos de historia natural de Italia e Inglaterra, y se estudiaron cambios en las puntuaciones de la NSAA 1 o 2 años después, una media de cambios a lo largo del curso de 1 año en pacientes diana de tratamiento de omisión del exón 53 fue de -4.1 puntos (J Neurol Neurosurg Psychicary 87, 149-55, 2016). Una cantidad modificada en la semana 48 de los pacientes del grupo administrado por Viltolarsen que cumplieron con los criterios de entrada de la publicación fue de +1.3 puntos. Según la publicación que informa los resultados de DHNS (Muscle Nerve 48, 55-67, 2013), el 20% de los pacientes con DMD de 7 a 9 años pierden su capacidad de aumento, pero no hubo tales pacientes en el grupo administrado con Viltolarsen. Además, el 10% de los pacientes con DMD de 7 a 9 años pierden la capacidad de subir 4 escalones, pero no hubo tales pacientes en el grupo

administrado con Viltolarsen. La velocidad disminuye con el envejecimiento, pero se observó un aumento en la velocidad en el grupo al que se administró Viltolarsen en su conjunto. Además, el 10% de los pacientes con DMD de 7 a 9 años pierden la capacidad de caminar de forma independiente, pero no había tales pacientes en NSP. La velocidad con respecto al tiempo para correr/caminar 10 metros disminuye con el envejecimiento, pero se observó un aumento en la velocidad en el grupo al que se administró Viltolarsen en su conjunto. Con respecto a un cambio en el nivel de expresión de distrofina desde la línea de base del valor cuantitativo de distrofina medido por WB, y cambios en las velocidades de la prueba del tiempo para pararse, el tiempo para subir 4 escaleras y el tiempo para correr/caminar 10 medidores en la semana 48 desde la línea de base, la presencia o ausencia de correlación y una ecuación de regresión lineal se calcularon usando Excel. Con respecto a la prueba de tiempo para estar de pie y la prueba de tiempo para correr/caminar 10 metros, hubo una correlación significativa entre el nivel de expresión de distrofina y el cambio de velocidad ($p<0.05$), y se sugirió que un cambio en la velocidad de la función motora aumenta con un aumento de distrofina.

[0207] **Aplicabilidad Industrial**

Según la presente invención, se proporciona una composición

farmacéutica para uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, que tiene una composición estable de NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen). Además, con respecto a una composición farmacéutica que comprende NS-065/NCNP-01 (Viltolarsen), se proporcionan dosificación y método de administración, que exhiben tratamientos eficaces de DMD y están en un rango seguro para pacientes humanos. Usando la composición farmacéutica, los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne se pueden reducir de manera efectiva con efectos secundarios bajos.