

ÁCIDO NUCLEICO ANTISENTIDO QUE INDUCE LA OMISIÓN DEL EXÓN 50

CAMPO TÉCNICO

[001] La presente invención se refiere a un oligómero antisentido que induce el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana, y una composición farmacéutica que comprende el oligómero antisentido.

TÉCNICA ANTECEDENTE

[002] La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es la forma más frecuente y grave de atrofia muscular progresiva hereditaria que se desarrolla en uno de cada aproximadamente 3,500 niños recién nacidos. Aunque las funciones motoras en pacientes con DMD rara vez son diferentes de las de seres humanos sanos en la infancia y la niñez, su debilidad muscular se observa en niños de alrededor de 4 a 5 años de edad. Entonces, la debilidad muscular en pacientes con DMD progresa a la pérdida de la ambulación para aproximadamente los 12 años y la muerte debido a la insuficiencia cardíaca o respiratoria en los años veinte. En la actualidad, no hay suficiente terapia para DMD, y se ha deseado fuertemente desarrollar un agente terapéutico efectivo.

[003] Se conoce que la DMD se provoca por una mutación en el gen de distrofina. El gen de distrofina se ubica en el cromosoma X y es un gen enorme que consta de 2.2 millones de pares de bases de ADN. El ADN se transcribe en precursores de ARNm, y los intrones se remueven por empalme para sintetizar ARNm de 11,058 bases que corresponden a una región traducida, en la que se unen 79 exones. Este ARNm se traduce en 3,685 aminoácidos para producir la proteína distrofina. La proteína distrofina se asocia con el mantenimiento de la estabilidad de membrana en las células musculares y es necesaria para hacer a las células musculares menos frágiles. El gen de distrofina de pacientes con DMD contiene una mutación y, por lo tanto, la proteína distrofina, que es funcional en las células musculares, rara vez se expresa. Por lo tanto, la estructura de las células musculares no se puede mantener en el cuerpo de los pacientes con DMD, lo que conduce a una gran afluencia de iones de calcio en las células musculares. Por consiguiente, se presenta una respuesta tipo inflamación para promover la fibrosis y hacer difícil la regeneración de las células musculares.

[004] La distrofia muscular de Becker (BMD) también se provoca por una mutación en el gen de distrofina. Los síntomas implican debilidad muscular acompañada por atrofia de músculos, pero son habitualmente leves y lentos en el progreso de la debilidad muscular, en comparación a DMD. En muchos casos, su inicio es en la edad adulta. Se considera que las diferencias en los síntomas clínicos entre DMD y BMD residen en si el marco de lectura para aminoácidos en la traducción de ARNm de distrofina en la proteína distrofina se ve interrumpido por la mutación o no (literatura no de patente 1). Más específicamente, en DMD, la presencia de mutación cambia el marco de lectura de aminoácidos y, por lo tanto, la proteína distrofina funcional rara vez se expresa, en tanto que en BMD la proteína distrofina que funciona, aunque imperfectamente, se produce debido que el marco de lectura de aminoácidos se conserva, en tanto que una parte de los exones se eliminan por la mutación.

[005] Se espera que el salto de exones sirva como un método para tratar DMD. Este método implica modificar el empalme para restaurar el marco de lectura de aminoácidos de ARNm de distrofina e inducir la expresión de la proteína distrofina que tiene la función parcialmente restaurada (literatura

no de patente 2). La parte de secuencia de aminoácidos, que es una diana de salto de exones, se perderá. Por esta razón, la proteína distrofina expresada por este tratamiento llega a ser más corta que la normal, pero puesto que se mantiene el marco de lectura de aminoácidos, la función para estabilizar las células musculares se retiene parcialmente. Por consiguiente, se espera que el salto de exones conduzca a DMD a los síntomas similares a esos de BMD, que es más leve. El enfoque de salto de exones ha pasado las pruebas en animales utilizando ratones o perros y ahora se evalúa en ensayos clínicos en pacientes humanos con DMD.

[006] El salto de un exón se puede inducir por la unión de ácidos nucleicos antisentido que se dirigen a ya sea el sitio de empalme de 5' o 3' o a ambos sitios, o a sitios internos del exón. Un exón se incluirá en el ARNm sólo cuando ambos sitios de empalme de este se reconocen por el complejo de empalmosoma. Por lo tanto, el salto de exones se puede inducir al dirigirse a los sitios de empalme con ácidos nucleicos antisentido. Además, la unión de una proteína de SR a un potenciador de empalme exónico (ESE) se considera necesaria para que un exón se reconozca por el mecanismo de empalme. Por consiguiente, el salto de exones también se puede inducir al dirigirse a ESE.

[007] Puesto que una mutación del gen de distrofina puede variar dependiendo de los pacientes con DMD, los ácidos nucleicos antisentido se necesitan diseñar con base en el sitio o tipo de respectiva mutación genética. En el pasado, los ácidos nucleicos antisentido que inducen el salto de exones para los 79 exones se produjeron por Steve Wilton, et al., Universidad de Australia Occidental (Literatura no de patente 3), y los ácidos nucleicos antisentido que inducen el salto de exones para 39 exones se produjeron por Annemieke Aartsma-Rus, et al., Países Bajos (Literatura no de patente 4).

[008] Se considera que aproximadamente 4% de todos los pacientes con DMD se pueden tratar al saltar el exón 50 (en lo sucesivo conocido como "exón 50") (Literatura no de patente 5). En los últimos años, una pluralidad de organizaciones de investigación, incluyendo el solicitante, reportaron sobre los estudios donde el exón 50 en el gen de distrofina se dirigió para el salto de exón (Literaturas de patente 1 a 6 y Literatura no de patente 6).

Lista de citas

Literatura de patente

[009] Literatura de Patente 1. Publicación Internacional WO2013/100190

Literatura de Patente 2. Publicación Internacional WO2004/048570

Literatura de Patente 3. Publicación Internacional WO2006/000057

Literatura de Patente 4. Publicación Internacional WO2010/050802

Literatura de Patente 5. Publicación Internacional WO2010/048586

Literatura de Patente 6. Publicación Internacional WO2011/057350

[0010] Literatura No de Patente 1. Mónaco A. P. et al., Genomics 2:90–95 (1988)

Literatura No de Patente 2. Matsuo M., Brain and Development 18:167–172 (1996)

Literatura no de patente 3. Wilton S. D. et al., Molecular Therapy 15:1288–96 (2007)

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

Literatura No de Patente 5. Bladen C. L. et al., Human Mutation 36:395–402 (2015)

Literatura No de Patente 6. Bo Wu et al., PLoSOne 6(5):e19906 (2011)

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Problema técnico

[0011] En las circunstancias anteriores, se han deseado oligómeros antisentido novedosos que induzcan el salto de exón 50 en el gen de distrofina con alta eficiencia. Además, se han deseado oligómeros antisentido que tengan excelentes propiedades físicas (por ejemplo, solubilidad) como medicamentos en tanto que se mantiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina con alta eficiencia.

Solución al problema

[0012] Como resultado de estudios detallados del contenido técnico de los documentos anteriores y la estructura del gen de distrofina, los presentes inventores han encontrado que el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana se induce con alta eficiencia al administrar el oligómero antisentido que tiene una secuencia de base representada por cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5. Los presentes inventores también han encontrado que el oligómero antisentido tiene una excelente solubilidad en tanto que se induce el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana con alta eficiencia. Con base en este hallazgo, los presentes inventores han logrado la presente invención.

[0013] Es decir, la presente invención es como sigue.

[1] Un oligómero antisentido que se selecciona del grupo que consta de (a) a (d) a continuación:

(a) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5;

(b) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de base que tiene eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5 bases en la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5, y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana;

(c) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de base que tiene al menos 80% de identidad de secuencia a una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana; y

(d) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas a un oligonucleótido que consta de una secuencia de base complementaria a la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

[2] Un oligómero antisentido que se selecciona del grupo que consta de (e) a (h) a continuación:

(e) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5;

(f) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de base que tiene eliminación y/o sustitución de 1 a 5 bases en la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5, y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana;

(g) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de base que tiene al menos 80%

de identidad de secuencia a una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana; y

(h) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas altas a un oligonucleótido que consta de una secuencia de base complementaria a la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana, o una sal farmacéuticamente aceptable o hidrato del mismo.

[3] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con [1] o [2] anterior, en donde

el oligómero antisentido es

un oligómero antisentido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad de secuencia a una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana.

[4] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de [1] a [3] anterior, en donde el oligómero antisentido es un oligonucleótido.

[5] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con [4] anterior, en donde la porción azúcar y/o la porción enlace fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido se modifican.

[6] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con [4] o [5] anterior, en donde la porción azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo 2'-OH se reemplaza por cualquiera seleccionado del grupo que consta de OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br e I (en donde R es un alquilo o un arilo y R' es un alquileo).

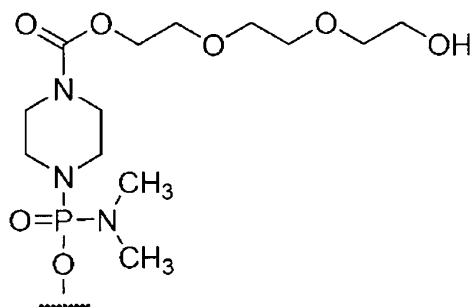
[7] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de [4] a [6] anterior, en donde la porción enlace fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es cualquiera que se selecciona del grupo que consta de un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforamidato y un enlace boranofosfato.

[8] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de [1] a [3] anterior, en donde el oligómero antisentido es un oligómero morfolino.

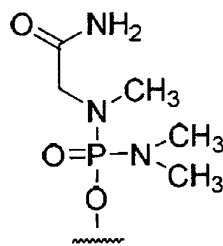
[9] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con [8] anterior, en donde el oligómero antisentido es un oligómero de morfolino de fosfordiamidato.

[10] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con [8] o [9] anterior, en donde el extremo 5' es cualquiera de las fórmulas químicas (1) a (3) a continuación:

Fórmula 1



(1)



(2)



(3)

[11] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de [1] a [10] anterior, en donde la longitud del oligómero antisentido es de 19 o 20 bases.

[12] Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende el oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de [1] a [11] anterior.

[13] La composición farmacéutica de acuerdo con [12] anterior, que comprende además un portador farmacéuticamente aceptable.

[14] La composición farmacéutica de acuerdo con [12] o [13] anterior para administrarse a un paciente con distrofia muscular, en donde el paciente es un paciente que tiene una mutación que es susceptible del salto de exón 50 en el gen de distrofina.

[15] La composición farmacéutica de acuerdo con [14] anterior, en donde el paciente tiene el gen de distrofina que tiene al menos una mutación de cambio de marco provocada por la eliminación de un exón en la vecindad de exón 50 y en el que el marco de lectura de aminoácidos se corrige por salto de exón 50.

[16] La composición farmacéutica de acuerdo con [14] o [15] anterior, en donde el paciente tiene una mutación de cambio de marco provocada por eliminaciones de los exones 51, 51-53, 51-55 o 51-57 en el gen de distrofina.

[17] La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [14] a [16] anterior, en donde el paciente es un ser humano.

[18] El uso del oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de [1] a [11] anterior en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la distrofia muscular.

[19] Un método para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende administrarle a un paciente con distrofia muscular una cantidad efectiva del oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de acuerdo con cualquiera de [1] a [11] anterior, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [12] a [16] anterior.

[20] El método para el tratamiento de acuerdo con [19] anterior, en donde el paciente es un ser humano.

[21] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este de

acuerdo con cualquiera de [1] a [11] anterior, o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de [12] a [16] anterior para uso en el tratamiento de la distrofia muscular.

[22] El oligómero antisentido o la sal o hidrato farmacéuticamente aceptable de este, o la composición farmacéutica de acuerdo con [21] anterior, en donde en el tratamiento, un paciente con distrofia muscular es un ser humano.

Efectos de invención

[0014] La presente invención puede proporcionar un oligómero antisentido que induce el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana con alta eficiencia. La presente invención puede proporcionar un oligómero antisentido que tiene una excelente solubilidad en tanto que se mantiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana con alta eficiencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0015] La figura 1 muestra la eficiencia de salto de exón 50 en el gen de distrofina humana por oligómeros antisentido de PMO No. 1 y 2 en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 2 muestra la eficiencia del salto de exón 50 en el gen de distrofina humana por oligómeros antisentido de PMO Nos. 1, 3, y 4 en células RD.

La figura 3 muestra la eficiencia del salto de exón 50 en el gen de distrofina humana por oligómeros antisentido de PMO Nos. 1, 5, 6 y 7 en células RD.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] En lo sucesivo, la presente invención se describe en detalle. Se propone que las modalidades descritas a continuación se presenten a manera de ejemplo simplemente para describir la invención, pero no se propone que se limite la presente invención sólo a las siguientes modalidades. La presente invención se puede implementar de varias maneras sin desviarse de la esencia de la invención.

1. Oligómero antisentido

[0017] La presente invención proporciona un oligómero antisentido (en lo sucesivo conocido como el "oligómero antisentido de la presente invención") que provoca el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana con alta eficiencia.

Exón 50 en el gen de distrofina humana

[0018] En la presente invención, el término "gen" incluye un gen genómico y también incluye ADNc, precursor de ARNm y ARNm. Preferentemente, el gen es un precursor de ARNm, es decir, pre-ARNm.

En el genoma humano, el gen de distrofina humana se ubica en el locus Xp21.2. El gen de distrofina humana tiene un tamaño de 2.2 millones de pares de bases y es el gen más grande entre los genes humanos conocidos. Sin embargo, las regiones de codificación del gen de distrofina humana son sólo 14 kb, distribuidas como 79 exones de principio a fin del gen de distrofina humana (Roberts, RG, et al., Genomics, 16: 536–538 (1993); y Koenig, M., et al., Cell 53 219–228, 1988). El pre-ARNm, que es el transcripto del gen de distrofina humana, se somete a empalme para generar ARNm maduro de 14 kb. Se conoce la secuencia de base del gen de distrofina tipo silvestre humana (GenBank Acceso No. NM_004006).

Una secuencia de base que incluye el exón 50 y una secuencia en la venticidad del extremo 5'

del intrón 50 en el gen de distrofina tipo silvestre humano se representa por SEQ ID NO: 1.

Oligómero antisentido

[0019] El oligómero antisentido de la presente invención se diseña para provocar el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana, modificando de esta manera la proteína codificada por el gen de distrofina tipo DMD en proteína distrofina tipo BMD. Por consiguiente, el exón 50 en el gen de distrofina que es una diana de salto de exón por el oligómero antisentido incluye tipos mutantes y tipo silvestre.

[0020] El oligómero antisentido de la presente invención es específicamente un oligómero antisentido que se selecciona del grupo que consta de (a) a (d) a continuación.

(a) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5;

(b) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de base que tiene eliminación, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 base en la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5, y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana;

(c) un oligómero antisentido que comprende una secuencia de base que tiene al menos 80%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 94%, o al menos 95% de identidad de secuencia a una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana; y

(d) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas a un oligonucleótido que consta de una secuencia de base complementaria a la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana.

[0021] Como otra modalidad, el oligómero antisentido de la presente invención es específicamente un oligómero antisentido que se selecciona del grupo que consta de (e) a (h) a continuación.

(e) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5;

(f) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de base que tiene eliminación y/o sustitución de 1 a 5, 1 a 4, 1 a 3, 1 a 2 o 1 base en la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5, y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana;

(g) un oligómero antisentido que consta de una secuencia de base que tiene al menos 80%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 94%, o al menos 95% de identidad de secuencia a una secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana; y

(h) un oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas altas a un oligonucleótido que consta de una secuencia de base complementaria a la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5 y tiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana.

[0022] Los oligómeros antisentido de (b) a (d) y los oligómeros antisentido de (f) a (h) son mutantes del oligómero antisentido de (a) y el oligómero antisentido de (e), respectivamente, en particular y se propone que correspondan a mutaciones (por ejemplo, polimorfismo) del gen de distrofina de los pacientes.

[0023] Como se usa en la presente, el término "oligómero antisentido que se hibrida en condiciones rigurosas" se refiere, por ejemplo, a un oligómero antisentido obtenido por hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación Southern o similares, utilizando como una sonda todo o parte de un oligonucleótido que consta de una secuencia de base complementaria a la secuencia de base de, por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5. El método de hibridación que se puede utilizar incluye métodos descritos en, por ejemplo, "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987–1997," etc.

[0024] Como se utiliza en la presente, el término "condiciones rigurosas" puede ser cualquiera de condiciones rigurosas bajas, condiciones rigurosas moderadas o condiciones rigurosas altas. El término "condiciones rigurosas bajas" es, por ejemplo, 5 × SSC, 5 × solución de Denhardt, 0.5% de SDS, 50% de formamida a 32°C. El término "condición rigurosa moderada" es, por ejemplo, 5 × SSC, 5 × solución de Denhardt, 0.5% de SDS, 50% de formamida a 42°C, o 5 × SSC, 1% de SDS, Tris–HCl 50 mM (pH 7.5), 50% de formamida a 42°C. El término "condición rigurosa alta" es, por ejemplo, (1) 5 × SSC, 5 × solución de Denhardt, 0.5% de SDS, 50% de formamida a 50°C, (2) 0.2 × SSC, 0.1% de SDS a 60°C, (3) 0.2 × SSC, 0.1% de SDS a 62°C, (4) 0.2 × SSC, 0.1% de SDS a 65°C, o (5) 0.1 × SSC, 0.1% de SDS a 65°C, pero no se limita a esto. Bajo estas condiciones, se espera que los oligómeros antisentido con más alta identidad de secuencia se obtengan de manera eficiente a temperaturas más altas. Múltiples factores se implican en la rigurosidad de hibridación que incluye temperatura, concentración de sonda, longitud de sonda, resistencia iónica, tiempo, concentración de sal y otros, y aquellos expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente estos factores para lograr rigurosidad similar. En la presente, el término "identidad de secuencia" se refiere a la identidad en todos los intervalos de secuencias de bases que se van a comparar entre un par de dos ciertos ácidos nucleicos y se indica por la relación (%) de bases coincidentes en la alineación óptima de las secuencias de bases producidas utilizando un algoritmo matemático conocido en el campo técnico de la presente invención. Por ejemplo, un oligómero antisentido que consta de una secuencia de base que tiene al menos "80% de identidad de secuencia" a un oligómero antisentido que consta de una secuencia de 20 bases significa un oligómero antisentido que tiene 16 o más bases idénticas al oligómero antisentido de 20 bases.

[0025] Cuando se utilizan kits comercialmente disponibles para la hibridación, por ejemplo, se puede utilizar un sistema de detección y marcado de Alkphos Direct (GE Healthcare). En este caso, de acuerdo con el protocolo anexo al kit, después de la incubación con una sonda marcada durante la noche, la membrana se lava con un agente amortiguador de lavado primario que contiene 0.1% (p/v) de SDS a 55°C, permitiendo de esta manera detectar oligómeros antisentido hibridados. De manera alternativa, cuando la sonda se marca con digoxigenina (DIG) utilizando un reactivo comercialmente disponible (por ejemplo, una mezcla de marcado de PCR (Roche Diagnostics), etc.) en la producción de una sonda con base en todo o parte de la secuencia complementaria a la secuencia de base de cualquiera de las SEQ ID NO: 3 a 5, la hibridación se puede detectar con un kit de detección de ácido nucleico DIG (Roche Diagnostics).

[0026] Además del oligómero antisentido descrito anteriormente, otro oligómero antisentido que se puede hibridar incluye oligómeros antisentido que tienen 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más, 99.1% o más, 99.2% o más, 99.3% o más, 99.4% o más, 99.5% o más, 99.6% o más, 99.7% o más, 99.8% o más, y 99.9% o más de identidad de secuencia a la secuencia de base de cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 5, como se calcula por el software de búsqueda de homología tal como FASTA y BLAST utilizando los parámetros predeterminados.

[0027] La identidad de secuencia se puede determinar utilizando FASTA (Ciencia 227 (4693): 1435–1441, (1985)) o algoritmo BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local) por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264–2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 90: 5873, 1993). Se han desarrollado programas llamados blastn, blastx, tblastn y tblastx con base en el algoritmo BLAST (Altschul SF, et al: J. Mol. Biol. 215: 403, 1990). Cuando se analiza una secuencia de base usando blastn, los parámetros son, por ejemplo, puntuación = 100 y longitud de palabra = 12. Cuando se utilizan programas BLAST y Gapped Blast, se emplean los parámetros predeterminados para cada programa.

[0028] El término "inducir (permitir) el salto del exón 50 en el gen de distrofina humana" se propone que signifique que por la unión del oligómero antisentido de la presente invención al sitio que corresponde al exón 50 y/o su intrón adyacente del transcrito (por ejemplo, pre-ARNm) del gen de distrofina humana, se presenta la exclusión de exón 50 y, por ejemplo, la secuencia de base que corresponde al extremo 5' del exón 52 se conecta a la secuencia de base que corresponde al extremo 3' del exón 49 en pacientes con DMD con eliminación de exón 51 cuando el transcrito se somete a empalme, dando por resultado de esta manera la formación de ARNm maduro que está libre de cambio de marco de codón.

[0029] Por lo tanto, los pacientes con DMD que tienen una mutación que es susceptible del salto de exón 50 en el gen de distrofina se pueden tratar por el salto de exón 50. Los ejemplos de estos pacientes con DMD incluyen pacientes con DMD que tienen el gen de distrofina que tiene al menos una mutación de cambio de marco provocada por la eliminación de un exón en la vecindad de exón 50 y en el que el marco de lectura de aminoácidos se corrige por salto de exón 50, y más específicamente incluyen pacientes con DMD que tienen una mutación de cambio de marco provocada por eliminaciones de exones 51, 51–53, 51–55, 51–57, etc. en el gen de distrofina.

[0030] En la presente, el término "unión" descrito anteriormente se propone que signifique que cuando el oligómero antisentido de la presente invención se mezcla con el transcrito del gen de distrofina humana, ambos se hibridan entre sí en condiciones fisiológicas para formar un ácido nucleico de doble hebra. El término "bajo condiciones fisiológicas" se refiere a condiciones establecidas para imitar el entorno *in vivo* en términos de pH, composición de sal y temperatura. Las condiciones son, por ejemplo, 25 a 40°C, preferentemente 37°C, pH 5 a 8, preferentemente pH 7.4 y 150 mM de concentración de cloruro de sodio.

[0031] Se puede confirmar si el salto de exón 50 en el gen de distrofina humana se provoca o no al introducir el oligómero antisentido de la presente invención en una célula que expresa distrofina (por

ejemplo, células de rhabdomyosarcoma humano), amplificar la región que circunda el exón 50 de ARNm del gen de distrofina humana del ARN total de la célula que expresa distrofina por RT-PCR y al realizar PCR anidada o análisis de secuencia en el producto amplificado por PCR. La eficiencia de salto ES (%) se puede determinar como sigue. El ARNm para el gen de distrofina humana se recolecta de células de prueba; y en el ARNm, se mide el nivel de polinucleótido de la banda que muestra que el exón 50 se salta (el nivel de polinucleótido "A") y el nivel de polinucleótido de la banda que muestra que el exón 50 no se salta (el nivel de polinucleótido "B"). Utilizando estos valores de medición de "A" y "B", la eficiencia se calcula por la siguiente ecuación (1). Para el cálculo de la eficiencia de salto, se puede hacer referencia a la Publicación Internacional WO2012/029986.

[0032] $ES = 100 \times A / (A + B) \dots (1)$

[0033] Preferentemente, el oligómero antisentido de la presente invención provoca el salto de exón 50 con la eficiencia de 10% o más, 20% o más, 30% o más, 40% o más, 50% o más, 60% o más, 70% o más, 80% o más, y 90% o más.

[0034] El oligómero antisentido de la presente invención incluye, por ejemplo, un oligonucleótido, oligómero de morfolino u oligómero de ácido nucleico de péptido (PNA), que tiene una longitud de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 o 35 bases. La longitud del oligómero antisentido es preferentemente de 16 a 25, de 16 a 23, 19 o 20 bases y se prefieren oligómeros de morfolino.

[0035] El oligonucleótido descrito anteriormente (en lo sucesivo conocido como "el oligonucleótido de la presente invención") es el oligómero antisentido de la presente invención compuesto de nucleótidos como unidades constituyentes. Estos nucleótidos pueden ser cualquiera de los ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y nucleótidos modificados.

[0036] El nucleótido modificado se refiere a uno que tiene nucleobases, porciones azúcar y/o porciones enlace fosfato de manera completa o parcialmente modificadas, que constituyen el ribonucleótido o desoxirribonucleótido.

[0037] En la presente invención, la nucleobase incluye, por ejemplo, adenina, guanina, hipoxantina, citosina, timina, uracilo, y bases modificadas de los mismos. Los ejemplos de estas bases modificadas incluyen, pero no se limitan a, pseudouracilo, 3-metiluracilo, dihidouracilo, 5-alquilcitosinas (por ejemplo, 5-metilcitosina), 5-alquiluracilos (por ejemplo 5-etiluracilo), 5-halouracilo (5-bromouracilo), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidinas (6-metiluracilo), 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil) uracilo, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, 1-metiladenina, 1-metilhipoxantina, 2,2-dimetilguanina, 3-metilcitosina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, 5-metilaminometiluracilo, 5-metilcarbonilmetiluracilo, 5-metiloxiuracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracilo-5-oxiacético, 2-tiocitosina, purina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, isoguanina, indol, imidazol, xantina, etc.

[0038] La modificación de la porción azúcar puede incluir, por ejemplo, modificaciones en la posición de 2' de ribosa y modificaciones de las otras posiciones del azúcar. La modificación en la posición de 2' de ribosa incluye una modificación que reemplaza la 2'-OH de ribosa con OR, R, R'OR, SH, SR,

NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br o I, en donde R representa un alquilo o un arilo y R' representa un alquileo.

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

[0039] Una modificación de la porción enlace fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de remplazo de enlace fosfodiéster con enlace fosforotioato, enlace fosforoditioato, enlace fosfonato de alquilo, enlace fosforamidato o enlace boranofosfato (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (cf., por ejemplo, Japan Domestic Re-Publications of PCT Application Nos. 2006/129594 y 2006/038608).

[0040] En esta invención, el alquilo incluye preferentemente un alquilo recto o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen metilo, etilo, *n*-propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *sec*-butilo, *ter*-butilo, *n*-pentilo, isopentilo, neopentilo, *ter*-pentilo, *n*-hexilo e isohexilo. El alquilo puede estar sustituido opcionalmente. Los ejemplos de estos sustituyentes son un halógeno, un alcoxi, ciano y nitro. El alquilo se puede sustituir con 1 a 3 sustituyentes.

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

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

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

[0041] En esta invención, el arilo incluye preferentemente un arilo que tiene de 6 a 10 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen fenilo, α -naftilo y β -naftilo. Entre otros, se prefiere el fenilo. El arilo puede estar sustituido opcionalmente. Los ejemplos de estos sustituyentes son un alquilo, un halógeno, un alcoxi, ciano y nitro. El arilo se puede sustituir con uno a tres de estos sustituyentes.

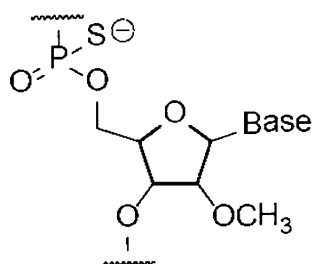
En esta invención, el alquileo incluye preferentemente un alquileo recto o ramificado que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los ejemplos específicos incluyen metileno, etileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno, 2-(etil) trimetileno y 1-(metil) tetrametileno.

En esta invención, el acilo incluye un alcanilo o aroilo recto o ramificado. Los ejemplos del alcanilo incluyen formilo, acetilo, 2-metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, etc. Los ejemplos del aroilo incluyen benzoilo, toluoilo y naftoilo. El aroilo puede estar sustituido opcionalmente en posiciones sustituibles y puede estar sustituido con un alquilo.

[0042] El oligonucleótido de la presente invención es preferentemente el oligómero antisentido de la presente invención que comprende una unidad constituyente representada por la fórmula general a

continuación en donde el grupo –OH en la posición de 2' de ribosa se sustituye con metoxi y la porción enlace fosfato es un enlace fosforotioato:

Fórmula 2

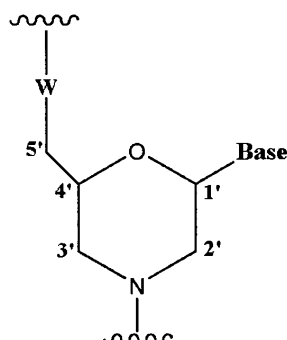


en donde la base representa una nucleobase.

[0043] El oligonucleótido de la presente invención se puede sintetizar fácilmente utilizando varios sintetizadores automatizados (por ejemplo, oligopiloto AKTA plus 10/100 (GE Healthcare)). Alternativamente, la síntesis también se puede confiar a una organización de tercero (por ejemplo, Promega Inc., Takara Co., o Japan Bio Service Co.), etc.

[0044] El oligómero de morfolino de la presente invención es el oligómero antisentido de la presente invención que comprende la unidad constituyente representada por la fórmula general a continuación:

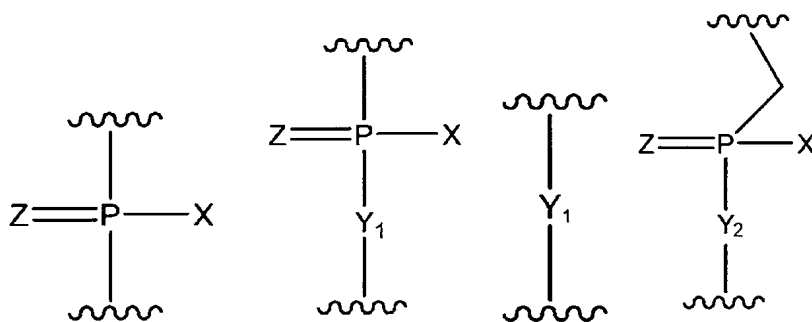
Fórmula 3



en donde la base tiene el mismo significado como se define anteriormente, y W representa un grupo mostrado por cualquiera de los siguientes grupos:

[0045]

Fórmula 4



en donde X representa –CH₂R¹, –O–CH₂R¹, –S–CH₂R¹, –NR²R³ o F;

R¹ representa H o un alquilo;

R² y R³, que pueden ser los mismos o diferentes, cada uno representa H, un alquilo, un

cicloalquilo o un arilo;

Y₁ representa O, S, CH₂ o NR¹;

Y₂ representa O, S o NR¹;

Z representa O o S.

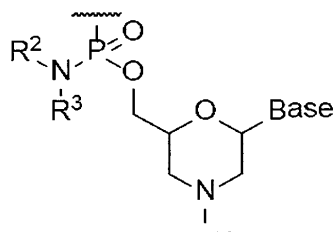
[0046] Los ejemplos de compuestos de monómero de morfolino que se utilizan en la síntesis del oligómero de morfolino de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, el siguiente compuesto de monómero de morfolino (A), compuesto de monómero de morfolino (C), compuesto de monómero de morfolino (T), y compuesto de monómero de morfolino (G).

[0047] Tabla 1

Compuesto monomérico de morfolino (A)	Compuesto monomérico de morfolino (C)	Compuesto monomérico de morfolino (T)	Compuesto monomérico de morfolino (G)

[0048] El oligómero de morfolino es preferentemente un oligómero que comprende una unidad constituyente representada por la fórmula general a continuación (oligómero de morfolino de fosforodiamidato (en lo sucesivo conocido como "PMO")).

[Fórmula 5]



en donde la base, R² y R³ tienen el mismo significado como se define anteriormente.

El oligómero de morfolino de la presente invención comprende uno donde se modifican todo o parte de las nucleobases, porciones anillo de morfolina, porciones enlace fosfato, extremo 3' y /o extremo 5' que constituyen el oligómero de morfolino.

[0049] Una modificación de la porción enlace fosfato incluye, por ejemplo, una modificación de remplazo con enlace fosforodiamidato, enlace fosforotioato, enlace fosforoditioato, enlace alquilfosfonato, enlace fosforamidato y enlace boranofosfato (Enya et al: Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154–9160) (cf., por ejemplo, Japan Domestic Re-Publications of PCT Application Nos. 2006/129594 y 2006/038608).

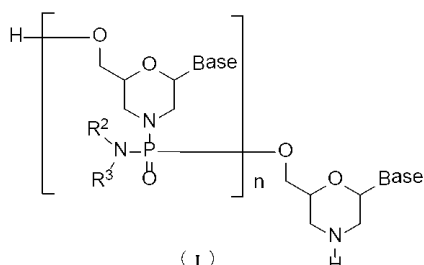
El oligómero de morfolino se puede producir de acuerdo con, por ejemplo, WO 1991/009033 o WO 2009/064471. En particular, el PMO se puede producir por el procedimiento descrito en WO 2009/064471 o se puede producir por el proceso mostrado a continuación.

[0050]

Método para producir PMO

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

Fórmula 6



en donde la base, R² y R³ tienen el mismo significado como se define anteriormente; y,

n es un número entero determinado de 1 a 99, preferentemente un número entero determinado de 15 a 34, 15 a 24 o 15 a 22, más preferentemente 18 o 19.

[0051] El PMO (I) se puede producir de acuerdo con un método conocido, por ejemplo, se puede producir al realizar los procedimientos en los siguientes pasos.

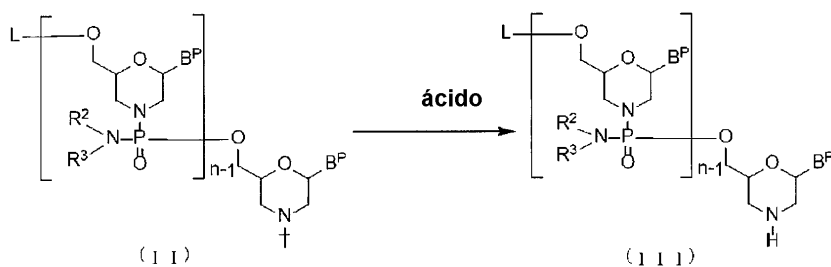
Los compuestos y reactivos utilizados en los pasos a continuación no se limitan en particular siempre que se utilicen comúnmente para preparar PMO.

Además, los siguientes pasos se pueden llevar a cabo por el método de fase líquida o el método de fase sólida (por de manera manual o al utilizar sintetizadores automatizados de fase sólida disponibles comercialmente). En la producción de PMO por el método de fase sólida, es preferible utilizar sintetizadores automatizados en vista de procedimientos de operación simples y síntesis exacta.

(1) Paso A:

[0052] El compuesto representado por la fórmula general (II) a continuación (en lo sucesivo conocido como compuesto (II)) se hace reaccionar con un ácido para preparar el compuesto representado por la fórmula general (III) a continuación (en lo sucesivo conocido como compuesto (III)):

Fórmula 7



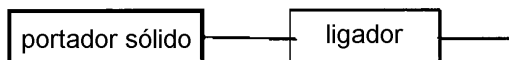
en donde n, R² y R³ tienen el mismo significado como se define anteriormente;

cada B^p representa independientemente una nucleobase que se puede proteger opcionalmente;

T representa tritilo, monometoxitritilo o dimetoxitritilo; y,

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

Fórmula 8



(I V)

[0053] La "nucleobase" para BP incluye la misma "nucleobase" que en la base, siempre que el grupo amino o grupo hidroxilo en la nucleobase mostrada por BP se pueda proteger.

Este grupo protector para el grupo amino no se limita en particular siempre que se utilice como un grupo protector para ácidos nucleicos. Los ejemplos específicos incluyen benzoilo, 4-metoxibenzoilo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-ter-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo y (dimetilamino)metileno. Los ejemplos específicos del grupo protector para el grupo hidroxilo incluyen 2-cianoetilo, 4-nitrofenetilo, fenilsulfonietilo, metilsulfonietilo, trimetilsilietilo, fenilo, que puede estar sustituido por 1 a 5 grupos de retirada de electrones en posiciones sustituibles opcionales, difenilcarbamoilo, dimetilcarbamoilo, dietilcarbamoilo, metilfenilcarbamoilo, 1-pirrolidinilcarbamoilo, morfolinocarboilo, 4-(ter-butilcarboxi)bencilo, 4-[(dimetilamino)carboxi]bencilo y 4-(fenilcarboxi)bencilo, (cf., por ejemplo, WO 2009/064471).

[0054] El "portador sólido" no se limita en particular siempre que sea un portador utilizable para la reacción de fase sólida de ácidos nucleicos. Se desea que el portador sólido tenga las siguientes propiedades: por ejemplo, (i) es moderadamente soluble en reactivos que se pueden utilizar para la síntesis de derivados de ácido nucleico de morfolino (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, N-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético); (ii) es químicamente estable a los reactivos que se pueden utilizar para la síntesis de derivados de ácido nucleico de morfolino; (iii) se puede modificar químicamente; (iv) se puede cargar con derivados de ácido nucleico de morfolino deseados; (v) tiene una resistencia suficiente para soportar alta presión a través de tratamientos; y (vi) tiene un cierto intervalo y distribución de diámetro de partícula. Específicamente, poliestireno hinchable (por ejemplo, resina de poliestireno de aminometilo, reticulada con divinilbenceno al 1% (200–400 malla) (2.4–3.0 mmol/g) (Tokyo Chemical Industry), resina de poliestireno aminometilada · HCl [divinilbenceno 1%, 100–200 malla] (Peptide Institute, Inc.), poliestireno no hinchable (por ejemplo, Soporte de cebador (GE Healthcare)), poliestireno unido a cadena de PEG (por ejemplo, resina de NH₂-PEG (Watanabe Chemical Co.), resina TentaGel), vidrio de poro controlado (CPG) (fabricado por, por ejemplo, CPG), vidrio de poro controlado por oxalilo (por ejemplo, Alul et al., Nucleic Acids Research, Vol. 19, 1527 (1991)), soporte derivado de glicol de soporte de TentaGel-aminopolietilenglicol (por ejemplo, Wright et al., cf., Tetrahedron Letters, Vol. 34, 3373 (1993)), y un copolímero de poros-poliestireno/divinilbenceno.

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

[0055] Este paso se puede realizar al hacer reaccionar el compuesto (II) con un ácido.

[0056] El "ácido" que se puede utilizar en este paso incluye, por ejemplo, ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético y ácido tricloroacético. La cantidad de ácido utilizada está apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 0.1 mol de equivalente a 1000 mol de equivalentes para 1 mol del compuesto (II), preferentemente en un intervalo de 1 mol de equivalente a 100 mol de equivalentes para 1 mol del compuesto (II).

Se puede utilizar una amina orgánica en combinación con el ácido descrito anteriormente. La amina orgánica no se limita en particular e incluye, por ejemplo, trietilamina. La cantidad de amina orgánica utilizada está apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 0.01 mol de equivalente a 10 mol de equivalentes, y preferentemente en un intervalo de 0.1 mol de equivalente a 2 mol de equivalentes, para 1 mol del ácido.

Cuando se utiliza una sal o mezcla del ácido y la amina orgánica en este paso, la sal o mezcla incluye, por ejemplo, una sal o mezcla de ácido trifluoroacético y trietilamina, y más específicamente, una mezcla de 1 equivalente de trietilamina y 2 equivalentes de ácido trifluoroacético.

El ácido que se puede utilizar en este paso también se puede utilizar en la forma de una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%. El solvente no se limita en particular en la medida en que es inerte a la reacción, e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua, o una mezcla de los mismos.

[0057] La temperatura de reacción en la reacción descrita anteriormente está preferentemente en un intervalo de, por ejemplo, 10°C a 50°C, más preferentemente, en un intervalo de 20°C a 40°C, y más preferentemente, en un intervalo de 25°C a 35°C.

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

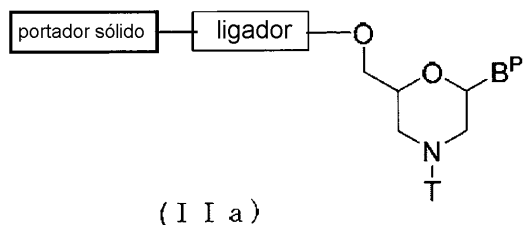
[0058] Después de completar este paso, se puede adicionar una base, si es necesario, para neutralizar el ácido que permaneció en el sistema. La "base" no se limita en particular e incluye, por ejemplo, diisopropiletilamina. La base también se puede usar en la forma de una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0.1% (v/v) a 30% (v/v).

El solvente utilizado en este paso no se limita en particular siempre que sea inerte a la reacción, e incluya diclorometano, acetonitrilo, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua, y una mezcla de los mismos. La temperatura de reacción está preferentemente en un intervalo de, por ejemplo, 10°C a 50°C, más preferentemente, en un intervalo de 20°C a 40°C, y más preferentemente, en un intervalo de 25°C a 35°C.

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

[0059] En el compuesto (II), el compuesto de la fórmula general (IIa) a continuación (en lo sucesivo, el compuesto (IIa)), en donde n es 1 y L es un grupo (IV), se puede producir por el siguiente procedimiento.

Fórmula 9

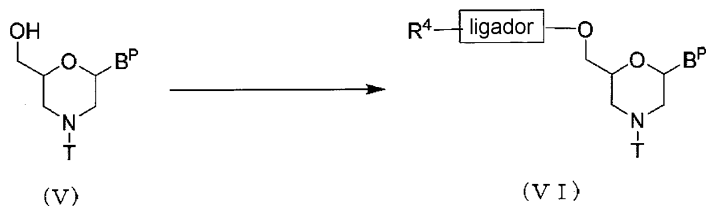


en donde B^P, T, ligador y portador sólido tienen el mismo significado como se define anteriormente.

Paso 1:

[0060] El compuesto representado por la fórmula general (V) a continuación se hace reaccionar con un agente acilante para preparar el compuesto representado por la fórmula general (VI) a continuación (en lo sucesivo conocido como compuesto (VI)).

Fórmula 10

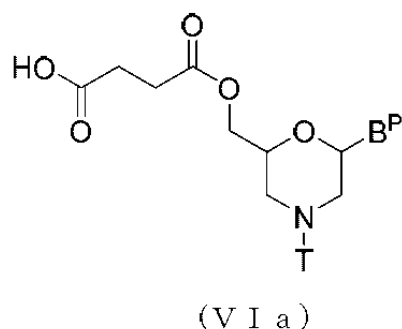


en donde B^P, T y el ligador tienen el mismo significado como se define anteriormente; y, R⁴ representa hidroxí, un halógeno, grupo carboxilo o amino.

[0061] Este paso se puede llevar a cabo por procedimientos conocidos para introducir ligadores, utilizando el compuesto (V) como material de inicio.

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

Fórmula 11

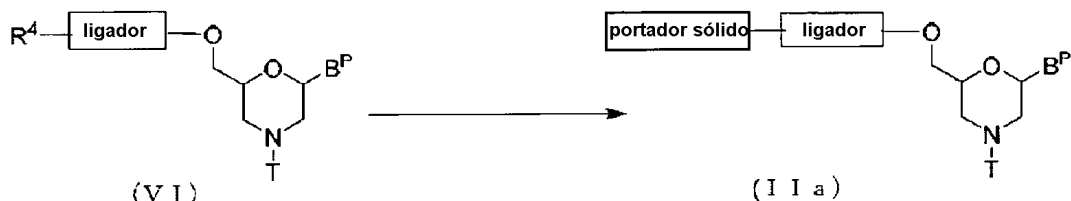


en donde B^P y T tienen el mismo significado como se define anteriormente.

Paso 2:

[0062] El compuesto (VI) se hace reaccionar con un portador sólido al utilizar un agente de condensación o similar para preparar el compuesto (IIa).

Fórmula 12

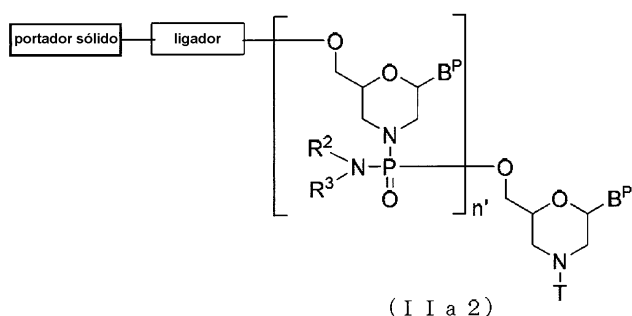


en donde B^P , R^4 , T, ligador y portador sólido tienen el mismo significado como se define anteriormente.

Este paso se puede realizar utilizando el compuesto (VI) y un portador sólido de acuerdo con un proceso conocido como reacción de condensación.

En el compuesto (II), el compuesto representado por la fórmula general (IIa2) a continuación en donde n es 2 a 99 (preferentemente un número entero determinado de 16 a 35, 16 a 25 o 16 a 23, preferentemente 19 o 20) y L es un grupo representado por la fórmula general (IV) se puede producir al utilizar el compuesto (IIa) como el material de inicio y al repetir el paso A y el paso B del método de producción de PMO descrito en la especificación para una cantidad deseada de veces.

Fórmula 13



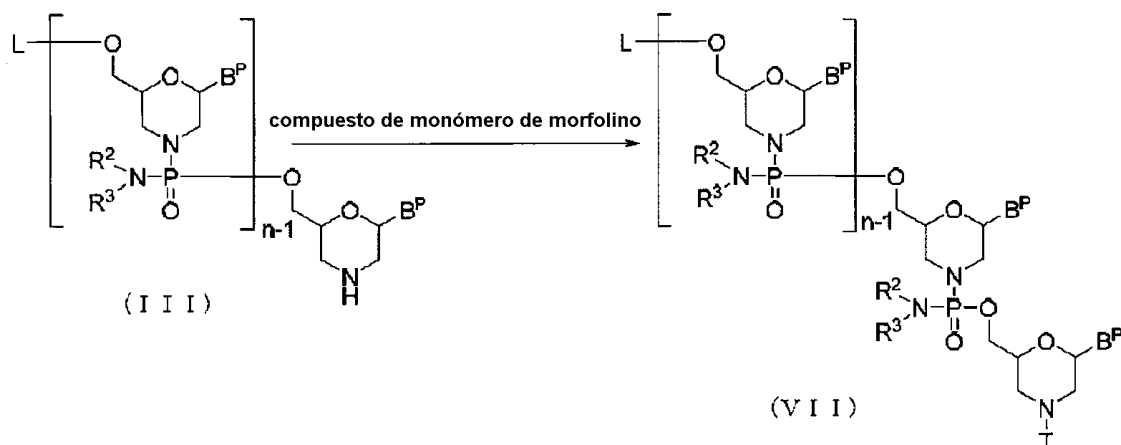
en donde B^P , R^2 , R^3 , T, el ligador y el portador sólido tienen el mismo significado como se define anteriormente; y,

n' representa 1 a 98 (en una modalidad específica, n' es, por ejemplo, 1 a 34, 1 a 24, 1 a 23, 1 a 22, 1 a 21, 1 a 20, 1 a 19, 1 a 18, 1 a 17, 1 a 16, 1 a 15).

(2) Paso B

[0063] El compuesto (III) se hace reaccionar con un compuesto de monómero de morfolino en la presencia de una base para preparar el compuesto representado por la fórmula general (VII) a continuación (en lo sucesivo conocido como compuesto (VII)):

Fórmula 14

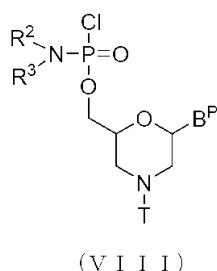


en donde cada B^p , L, n, R^2 , R^3 y T tienen el mismo significado como se define anteriormente.

[0064] Este paso se puede realizar al hacer reaccionar el compuesto (III) con el compuesto de mon6mero de morfolino en la presencia de una base.

[0065] El compuesto de mon6mero de morfolino incluye, por ejemplo, compuestos representados por la f6rmula general (VIII) a continuaci6n:

F6rmula 15



en donde B^p , R^2 , R^3 y T tienen el mismo significado como se define anteriormente.

La "base" que se puede utilizar en este paso incluye, por ejemplo, diisopropiletilamina, trietilamina y N-etilmorfolina. La cantidad de la base utilizada est1 apropiadamente, por ejemplo, en un intervalo de 1 mol de equivalente a 1000 mol de equivalentes para 1 mol del compuesto (III), preferentemente, 10 mol de equivalentes a 100 mol de equivalentes para 1 mol del compuesto (III).

El compuesto de mon6mero de morfolino y la base que se pueden utilizar en este paso tambi6n se pueden utilizar como una diluci6n con un solvente apropiado en una concentraci6n de 0.1% a 30%. El solvente no se limita en particular en la medida en que es inerte a la reacci6n, e incluye, por ejemplo, N,N-dimetilimidazolidona, N-metilpiperidona, DMF, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, o una mezcla de los mismos.

[0066] La temperatura de reacci6n est1 preferentemente en un intervalo de, por ejemplo, 0°C a 100°C, y m1s preferentemente, en un intervalo de 10°C a 50°C.

El tiempo de reacci6n puede variar dependiendo de la clase de la base utilizada y la temperatura de reacci6n, y est1 adecuadamente en un intervalo de 1 minutos a 48 horas en general, y preferentemente en un intervalo de 30 minutos a 24 horas.

[0067] Adem1s, despu6s de completar este paso, se puede adicionar un agente acilante, si es

necesario. El "agente acilante" incluye, por ejemplo, anhídrido acético, cloruro de acetilo y anhídrido fenoxiacético. El agente acilante también se puede utilizar como, por ejemplo, una dilución con un solvente apropiado en una concentración de 0.1% a 30%. El solvente no se limita en particular en la medida en que es inerte a la reacción, e incluye, por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, un alcohol (etanol, isopropanol, trifluoroetanol, etc.), agua, o una mezcla de los mismos.

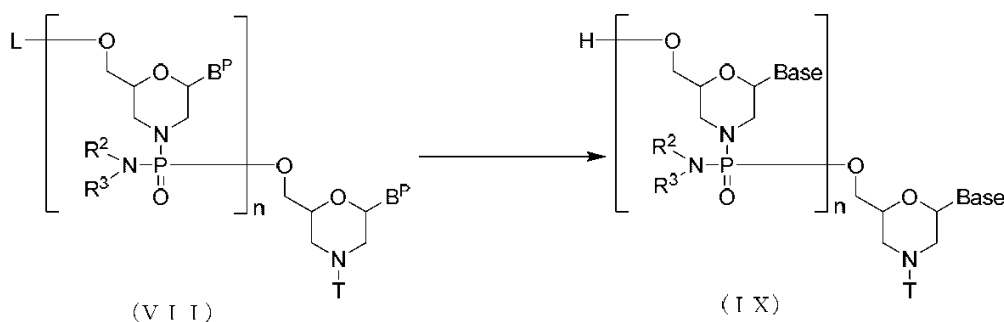
Si es necesario, también se puede utilizar una base tal como piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropiletilamina, N-etilmorfolina, etc. en combinación con el agente acilante. La cantidad del agente acilante utilizado está preferentemente en un intervalo de 0.1 mol de equivalente a 10000 mol de equivalentes, y más preferentemente en un intervalo de 1 mol de equivalente a 1000 mol de equivalentes. La cantidad de la base utilizada está apropiadamente en un intervalo de, por ejemplo, 0.1 mol de equivalente a 100 mol de equivalentes, y preferentemente en un intervalo de 1 mol de equivalente a 10 mol de equivalentes, para 1 mol del agente acilante.

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

(3) Paso C:

[0068] En el compuesto (VII) producido en el paso B, el grupo protector se remueve utilizando un agente de desprotección para preparar el compuesto representado por la fórmula general (IX).

Fórmula 16



en donde la base, B^P, L, n, R², R³ y T tienen el mismo significado como se define anteriormente.

[0069] Este paso se puede realizar al hacer reaccionar el compuesto (VII) con un agente de desprotección.

[0070] El "agente de desprotección" incluye, por ejemplo, agua de amoníaco conc. y metilamina. El "agente de desprotección" utilizado en este paso también se puede utilizar como una dilución con, por ejemplo, agua, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, DMF, N,N-dimetilimidazolidona, N-metilpiperidona, o una mezcla de estos solventes. Entre ellos, se prefiere el etanol. La cantidad del agente desprotector utilizado está apropiadamente, por ejemplo, en un

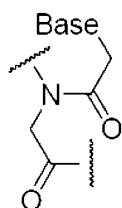
deseado se puede aislar y purificar (cf., por ejemplo, WO 1991/09033).

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

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

[0077] Un ácido nucleico de péptido es el oligómero antisentido de la presente invención que tiene un grupo representado por la siguiente fórmula general como la unidad constituyente:

Fórmula 18



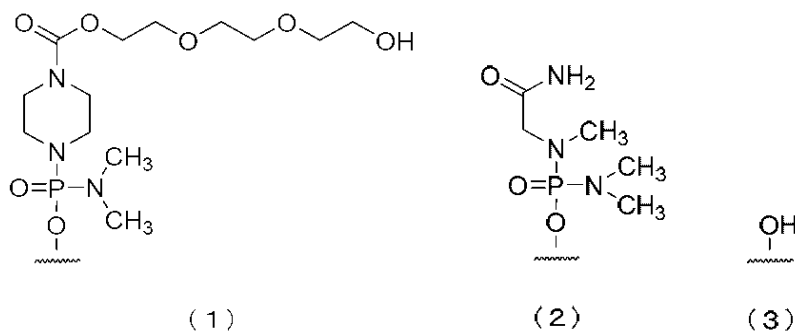
en donde la base tiene el mismo significado como se define anteriormente.

[0078] Los ácidos nucleicos de péptido se pueden preparar al hacer referencia, por ejemplo, a las siguientes literaturas.

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

[0079] En el oligómero antisentido de la presente invención, el extremo 5' puede ser cualquiera de los grupos mostrados por las fórmulas químicas (1) a (3) a continuación, y preferentemente es (3)-OH.

Fórmula 19



En lo sucesivo, los grupos mostrados por (1), (2) y (3) anteriores se conocen como "grupo (1)",

"grupo (2)" y "grupo (3)", respectivamente.

[0080] El oligómero antisentido de la presente invención puede comprender un compuesto con un átomo de fósforo estereoquímicamente puro debido a que el átomo de fósforo de la porción enlace fosfato sirve como un centro asimétrico. Una persona experta en la técnica puede obtener formas ópticamente activas puras a partir de mezclas isoméricas (WO2017/024264). El oligómero antisentido de la presente invención se puede sintetizar como una forma ópticamente activa pura. Una persona experta en la técnica puede obtener formas ópticamente activas puras por el control de reacciones de síntesis (publicación abierta japonesa 2018-537952).

2. Oligómero antisentido conjugado por péptido

[0081] El oligómero antisentido de la presente invención puede formar un complejo con un péptido funcional que tiene como objetivo mejorar la efectividad (por ejemplo, un péptido permeable a la membrana que tiene el objetivo de mejorar la eficacia de administración a células diana) (WO2008/036127, WO2009/005793, WO2012/150960, WO2016/187425, WO2018/118662, WO2018/118599, WO2018/118627, J. D. Ramsey, N. H. Flynn, *Pharmacology & Therapeutics* 154, 78-86 (2015), M. K. Tsoumpira et al., *EBioMedicine*, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.06.036>). El sitio de conjugación no se limita en particular. Preferentemente, el extremo 5' o extremo 3' del oligómero antisentido se conecta (conjuga) al extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del péptido funcional.

Como otra modalidad, el oligómero antisentido de la presente invención y el péptido funcional pueden formar un complejo (conjugado) mediante un ligador. El ligador no se limita en particular. Preferentemente, el extremo 5' o extremo 3' del oligómero antisentido se conecta a un extremo del ligador en tanto que el extremo amino-terminal o carboxilo-terminal del péptido funcional se conecta al otro extremo del ligador. Puede existir un aminoácido adicional entre el péptido funcional y el ligador.

3. Composición farmacéutica

[0082] El oligómero antisentido de la presente invención, incluso si su longitud es corta en comparación a los oligómeros antisentido de técnica anterior, puede inducir el salto de exón 50 con alta eficiencia. El oligómero antisentido de la presente invención tiene excelente solubilidad en tanto que se mantiene una actividad para inducir el salto de exón 50 con alta eficiencia. Por lo tanto, se espera que las condiciones de distrofia muscular se puedan mejorar con alta eficiencia al administrar el oligómero antisentido de la presente invención a pacientes con DMD que tienen una mutación que es susceptible de salto de exón 50 (por ejemplo, mutación de cambio de marco y mutación de cambio de sentido/mutación sin sentido en el exón 50) en el gen de distrofina. Por lo tanto, se espera que las condiciones de distrofia muscular se puedan mejorar con alta eficiencia al administrar el oligómero antisentido de la presente invención, por ejemplo, al menos a pacientes con DMD que tienen el gen de distrofina mutante predeterminado que tiene la eliminación de un exón en la vecindad del exón 50. El gen de distrofina mutante predeterminado significa el gen de distrofina que tiene al menos una mutación de cambio de marco provocada por la eliminación de un exón en la vecindad de exón 50 y en el que el marco de lectura de aminoácidos se corrige por omisión (salto) de exón 50. Los ejemplos de pacientes que tienen este gen de distrofina mutante predeterminado incluyen pacientes con DMD

con una mutación de cambio de marco provocada por eliminaciones de exones 51, 51-53, 51-55, 51-57, etc.

Más específicamente, se espera que las condiciones de distrofia muscular se puedan mejorar con alta eficiencia al administrar la composición farmacéutica que comprende el oligómero antisentido de la presente invención a pacientes con DMD, que tiene mutación que se convierte en marco por salto de exón 50, por ejemplo, pacientes con eliminación de exón 51, pacientes con eliminación de exón 51-53, pacientes con eliminación de exón 51-55, pacientes con eliminación de exón 51-57, y así sucesivamente). Por ejemplo, cuando se utiliza la composición farmacéutica que comprende el oligómero antisentido de la presente invención, se pueden lograr los mismos efectos terapéuticos incluso en una dosis más pequeña que esa de los oligómeros de la técnica anterior. Por consiguiente, se pueden aliviar los efectos secundarios y estos son económicos.

El oligómero antisentido de la presente invención también es útil en la preparación de composiciones farmacéuticas debido a que el oligómero antisentido tiene una excelente solubilidad en tanto que se mantiene una actividad para inducir el salto de exón 50 con alta eficiencia.

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

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

En este método para el tratamiento, el oligómero antisentido de la presente invención se puede administrar en la composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular.

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

[0083] Los ejemplos de la sal farmacéuticamente aceptable del oligómero antisentido de la presente invención comprendida en la composición de la presente invención incluyen sales de metales alcalinos tal como sal de sodio, sal de potasio y sal de litio; sales de metales alcalinotérreos tal como sal de calcio y sal de magnesio; sales de metales tal como sal de aluminio, sal de hierro, sal de zinc, sal de cobre, sal de níquel, sal de cobalto, etc.; sales de amonio; sales de aminas orgánicas tal como sal de t-octilamina, sal de dibencilamina, sal de morfolina, sal de glucosamina, sal de éster de alquilo de fenilglicina, sal de etilendiamina, sal de N-metilglucamina, sal de guanidina, sal de dietilamina, sal de trietilamina, sal de dicitclohexilamina, sal de N,N'-dibencilendiamina, sal de cloroprocaína, sal de procaína, sal de dietanolamina, sal de N-bencilfenetilamina, sal de piperazina, sal de tetrametilamonio, sal de tris(hidroximetil)aminometano; sales de hidrohaluro tal como sal de ácido fluorhídrico, sal de clorhidrato, sal de bromhidrato y sal de yodhidrato; sales de ácido inorgánico tal como sal de nitrato, sal de perclorato, sal de sulfato, sal de fosfato, etc.; sales de ácido orgánico tal como sal de metanosulfonato, sal de trifluorometanosulfonato y sal de etanosulfonato; sal de

arilsulfonato tal como sal de bencenosulfonato y sal de p-toluenosulfonato; sales de ácido orgánico tal como sal de acetato sal, sal de malato, sal de fumarato, sal de succinato, sal de citrato, sal de tartrato, sal de oxalato, sal de maleato, etc.; y, sales de aminoácidos tal como sal de glicina, sal de lisina, sal de arginina, sal de ornitina, sal de ácido glutámico y sal de ácido aspártico. Estas sales se pueden producir por métodos conocidos. De manera alternativa, el oligómero antisentido de la presente invención que comprende la composición de la presente invención puede estar en la forma de un hidrato de este.

[0084] La ruta de administración para la composición de la presente invención no se limita en particular siempre que sea una ruta farmacéuticamente aceptable para la administración, y se puede elegir dependiendo del método de tratamiento. En vista de la facilidad en la administración a los tejidos musculares, se prefiere administración intravenosa, administración intraarterial, administración intramuscular, administración subcutánea, administración oral, administración de tejido, administración transdérmica, etc. Además, las formas de dosificación que están disponibles para la composición de la presente invención no están particularmente limitadas, e incluyen, por ejemplo, diversas inyecciones, agentes orales, goteos, inhalaciones, ungüentos, lociones, etc.

[0085] En la administración del oligómero antisentido de la presente invención a pacientes con distrofia muscular, la composición de la presente invención puede comprender un portador para promover la administración del oligómero a los tejidos musculares. Este portador no se limita en particular en la medida en que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos incluyen portadores catiónicos tal como liposomas catiónicos, polímeros catiónicos, etc., o portadores que utilizan una envoltura viral. Los ejemplos de liposomas catiónicos incluyen, por ejemplo, liposomas compuestos de 2-O-(2-dietilaminoetil) carabamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y fosfolípidos como los constituyentes esenciales (en lo sucesivo conocidos como "liposoma A"), oligofectamina (marca registrada) (Invitrogen Corp.), lipofectina (marca registrada) (Invitrogen Corp.), lipofectamina (marca registrada) (Invitrogen Corp.), lipofectamina 2000 (marca registrada) (Invitrogen Corp.), DMR1E-C (marca registrada) (Invitrogen Corp.), GeneSilencer (marca registrada) (Gene Therapy Systems), TransMessenger (marca registrada) (QIAGEN, Inc.), TransIT TKO (marca registrada) (Mirus) y Nucleofector II (Lonza). Entre otros, se prefiere el liposoma A. Los ejemplos de polímeros catiónicos incluyen JetSI (marca registrada) (Qbiogene, Inc.) y Jet-PEI (marca registrada) (polietilenimina, Qbiogene, Inc.). Un ejemplo de portadores que usan una envoltura viral incluye GenomeOne (marca registrada) (liposoma HVJ-E, Ishihara Sangyo). De manera alternativa, también se pueden utilizar los dispositivos médicos descritos en la Patente Japonesa No. 2924179 y los portadores catiónicos descritos en la Republicación Nacional Japonesa PCT No. 2006/129594 y 2008/096690.

Para más detalles, Patente de Estados Unidos de América No. 4,235,871, Patente de Estados Unidos de América No. 4,737,323, WO96/14057, "New RRC, Liposomes: Se puede hacer referencia a un enfoque práctico, IRL Press, Oxford (1990) páginas 33-104", etc.

[0086] Una concentración del oligómero antisentido de la presente invención comprendida en la composición de la presente invención puede variar dependiendo de la clase de portador, etc., y en una modalidad, está apropiadamente en un intervalo de 0.1 nM a 100 μ M, preferentemente en un

intervalo de 100 nM a 10 μ M. Una relación de peso del oligómero antisentido de la presente invención comprendida en la composición de la presente invención y el portador (portador/oligómero antisentido de la presente invención) puede variar dependiendo de la propiedad del oligómero, tipo de portador, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 a 100, preferentemente en un intervalo de 0.1 a 10.

[0087] La composición de la presente invención puede estar en la forma de una solución acuosa. En este caso, la composición de la presente invención puede comprender el oligómero antisentido de la presente invención 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. Alternativamente, la composición de la presente invención puede comprender el oligómero antisentido de la presente invención 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.

[0088] La composición de la presente invención puede estar en una forma seca. En este caso, para preparar la composición de la presente invención en una forma de solución acuosa, la composición de la presente invención en una forma seca que comprende, por ejemplo, 125 mg o 250 mg del oligómero antisentido de la presente invención en una forma seca se puede mezclar con 0.5 mL a 100 mL de agua (que corresponde al oligómero antisentido de la presente invención en una concentración de 1.25 mg/mL a 250 mg/mL o 2.5 mg/mL a 500 mg/mL), preferentemente con 1 mL a 50 mL de agua (que corresponde al oligómero antisentido de la presente invención en una concentración de 2.5 mg/mL a 125 mg/mL o 5 mg/mL a 250 mg/mL), más preferentemente con 5 mL a 10 mL de agua (que corresponden al oligómero antisentido de la presente invención en una concentración de 12.5 mg/mL a 25 mg/mL o 25 mg/mL a 50 mg/mL) y se utiliza.

[0089] Además del oligómero antisentido de la presente invención y el portador descrito anteriormente, los aditivos farmacéuticamente aceptables también se pueden formular opcionalmente en la composición de la presente invención. Los ejemplos de estos aditivos son ayudas de emulsificación (por ejemplo, ácidos grasos que tienen de 6 a 22 átomos de carbono y sus sales farmacéuticamente aceptables, albúmina y dextrano), estabilizadores (por ejemplo, colesterol, ácido fosfatídico, sacarosa, manitol, sorbitol y xilitol), agentes isotonzantes (por ejemplo, cloruro de sodio, glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol y xilitol), y agentes de control de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y trietanolamina). Uno o más de estos aditivos se pueden utilizar. El contenido del aditivo en la composición de la presente invención es apropiadamente 90% en peso o menos, preferentemente 70% en peso o menos y más preferentemente, 50% en peso o menos.

[0090] La composición de la presente invención se puede preparar al adicionar el oligómero antisentido de la presente invención a una dispersión de portador y al agitar adecuadamente la mezcla. Se pueden adicionar aditivos en un paso apropiado ya sea antes o después de la adición del oligómero antisentido de la presente invención. Cuando la composición de la presente invención está

en la forma de una solución acuosa, un solvente acuoso que se puede utilizar en la adición del oligómero antisentido de la presente invención no se limita particularmente en la medida en que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos del solvente acuoso incluyen agua inyectable o agua destilada inyectable, fluido de electrolito tal como solución salina fisiológica, etc., y fluido de azúcar tal como fluido de glucosa, fluido de maltosa, etc. Un experto en la técnica puede elegir apropiadamente las condiciones de pH y temperatura para este caso.

[0091] La composición de la presente invención se puede preparar, por ejemplo, en una forma líquida y su preparación liofilizada. En una modalidad de la composición de la presente invención en una forma seca, la preparación liofilizada se puede preparar al liofilizar la composición de la presente invención en una forma líquida de una manera convencional. La liofilización se puede realizar, por ejemplo, al esterilizar apropiadamente la composición de la presente invención en una forma líquida, al dispensar una alícuota en un recipiente de frasco, al realizar la congelación preliminar durante 2 horas en condiciones de aproximadamente -40 a -20°C , al realizar un secado primario a aproximadamente 0 a 10°C bajo presión reducida, y entonces al realizar un secado secundario a aproximadamente 15 a 25°C bajo presión reducida. En general, la preparación liofilizada de la composición de la presente invención se puede obtener al reemplazar el gas del frasco con gas nitrógeno y terminación de cadena.

[0092] La preparación liofilizada de la composición de la presente invención se puede utilizar en general después de la reconstitución por la adición de una solución adecuada opcional (líquido de reconstitución) y por la redisolución de la preparación. Este líquido de reconstitución incluye agua inyectable, solución salina fisiológica y otros fluidos de infusión. Un volumen del líquido de reconstitución puede variar dependiendo del uso propuesto, etc., no se limita en particular, y es adecuadamente 0.5 a 2 veces mayor que el volumen antes de la liofilización o no más de 500 mL.

[0093] Se desea controlar una dosis de la composición de la presente invención que se va a administrar, al tener en cuenta los siguientes factores: el tipo y forma de dosificación del oligómero antisentido de la presente invención comprendido en la composición; condiciones de los pacientes que incluyen edad, peso corporal, etc.; ruta de administración; y las características y extensión de la enfermedad. Una dosis diaria calculada como la cantidad del oligómero antisentido de la presente invención está en general en un intervalo de 0.1 mg a 10 g/humano, y preferentemente de 1 mg a 1 g/humano. Este intervalo numérico puede variar ocasionalmente dependiendo del tipo de la enfermedad diana, la ruta de administración y la molécula diana. Por lo tanto, una dosis más baja que el intervalo puede ser suficiente en alguna ocasión y, por el contrario, una dosis más alta que el intervalo se puede requerir ocasionalmente. La composición se puede administrar de una a varias veces al día o a intervalos de un día a varios días.

[0094] En otra modalidad de la composición de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un vector capaz de expresar el oligonucleótido de la presente invención y el portador descrito anteriormente. Este vector de expresión puede ser un vector capaz de expresar una pluralidad de los oligonucleótidos de la presente invención. La composición se puede formular con aditivos farmacéuticamente aceptables como en el caso de la composición de la

presente invención que comprende el oligómero antisentido de la presente invención. Una concentración del vector de expresión comprendido en la composición puede variar dependiendo del tipo de portador, etc., y en una modalidad, está apropiadamente en un intervalo de 0.1 nM a 100 μ M, preferentemente en un intervalo de 100 nM a 10 μ M. Una relación en peso del vector de expresión y el portador comprendido en la composición (portador/vector de expresión) puede variar dependiendo de la propiedad del vector de expresión, tipo del portador, etc., y está apropiadamente en un intervalo de 0.1 a 100, preferentemente en un intervalo de 0.1 a 10. El contenido del portador comprendido en la composición es el mismo que en el caso con la composición de la presente invención que comprende el oligómero antisentido de la presente invención, y un método para producir el mismo también es el mismo que en el caso con la composición de la presente invención.

[0095] En lo sucesivo, la presente invención se describirá en más detalle con referencia a los ejemplos y ejemplos de prueba a continuación, pero no se considera que se limita a estos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de oligómero antisentido

[0096] De acuerdo con el método descrito en WO2013/100190, los oligómeros antisentido mostrados en la tabla 1 (PMO No. 1 a 7 (SEQ ID NO: 2 a 8)) que se dirigieron a una secuencia de base parcial de exón 50 y/o su intrón de 3' adyacente (intrón 50) en el gen de distrofina humana se sintetizaron. La longitud completa de cada oligómero antisentido fue de 19 a 21 mero. También se muestra el valor teórico del peso molecular de cada oligómero antisentido y el valor encontrado de este por ESI-TOF-MS.

En la tabla 1, por ejemplo, "H50_109-129" representa que cuando la base de 5'-terminal de exón 50 en el gen de distrofina humana se cuenta como la primera base y sus bases en dirección 3' a la dirección 3' se numeran en orden, el oligómero antisentido se dirige a la secuencia de las bases 109 a 129. Puesto que la longitud completa del exón 50 es 109 bases, la secuencia de las bases 110 a 130 en la secuencia de base diana es una secuencia de base en el intrón 50 en este ejemplo.

Tabla 2

Tabla 1, Oligómeros antisentido sintetizados (PMO No. 1 a 7)

MO No.	Secuencia de base diana	Longitud completa	Secuencia de base de PMO	Peso molecular		SE Q ID NO
				Valor teórico	Valor encontrado	
1	H50_109-129	21	ATGGGATCCAGTATACTTACA	6946.42	6946.25	2
2	H50_110-129	20	ATGGGATCCAGTATACTTAC	6607.30	6607.72	3
3	H50_110-128	19	TGGGATCCAGTATACTTAC	6268.18	6268.26	4
4	H50_111-129	19	ATGGGATCCAGTATACTTA	6292.19	6291.8	5
5	H50_107-125	19	GATCCAGTATACTTACAGG	6277.19	6276.75	6
6	H50_108-126	19	GGATCCAGTATACTTACAG	6277.19	6277.13	7
7	H50_112-130	19	AATGGGATCCAGTATACTT	6292.19	6292.97	8

Ejemplo 2: Prueba de actividad de salto de exones del oligómero antisentido

Prueba *in vitro* de salto de exón 50 en el gen de distrofina humana

(1) Método de prueba

[0097] Usando un kit de nucleofector de línea celular de Amaxa L y Nucleofector II (Lonza), se transfectó 0.1 a 1 μ M de cada oligómero antisentido de la tabla 1 a 3.5×10^5 de células RD (línea

celular de rabdomiosarcoma humano, CCL-136, comprada de ATCC)). El programa de impulso utilizado para la transfección fue T-030.

Después de la transfección, las células RD se cultivaron durante tres noches en 2 mL del medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (Sigma, en lo sucesivo el mismo) que contenía suero fetal bovino (FBS) (Invitrogen) al 10% en condiciones de 37°C y CO₂ al 5%.

Las células RD transfectadas se lavaron una vez con PBS (Nissui, en lo sucesivo el mismo) y se adicionaron 350 µL de agente amortiguador RA1 (Takara Bio Inc.) que contenía 2-mercaptoetanol al 1% (Nacalai Tesque, Inc.) a las células. Después de que las células se dejaron reposar a temperatura ambiente durante unos pocos minutos para lisar las células, el lisado se recolectó en el filtro NucleoSpin (marca registrada) (Takara Bio Inc.). Se produjo un homogeneizado por centrifugación a 11,000 × g durante 1 minuto. El ARN total se extrajo de las células de acuerdo con el protocolo anexo al ARN NucleoSpin (marca registrada) (Takara Bio Inc.). La concentración del ARN total extraído se determinó utilizando un NanoDrop ONE (Thermo Fisher Scientific Inc.).

[0098] Se realizó RT-PCR de un paso con 400 ng del ARN total extraído utilizando un kit de RT-PCR de un paso QIAGEN (Qiagen) y un termociclador. Se preparó una solución de reacción de acuerdo con el protocolo anexo al kit. El termociclador utilizado fue TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc.). El programa de RT-PCR utilizado fue como sigue.

50°C, 30 minutos: reacción de transcripción inversa

95°C, 15 minutos: activación de polimerasa, inactivación de transcriptasa inversa, desnaturalización térmica de ADNc

[94°C, 30 segundos; 60°C, 30 segundos; 72°C, 1 minuto] × 35 ciclos: Amplificación de PCR

72°C, 10 minutos: extensión final

[0099] Las secuencias de bases del cebador directo y el cebador inverso utilizados para RT-PCR se proporcionan a continuación.

Cebador directo: 5'- AACAAACCGGATGTGGAAGAG -3' (SEQ ID NO: 9)

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

[00100] El producto de reacción, 1 µL de la PCR anterior se analizó utilizando un Bioanalizador (Agilent Technologies, Inc.) y MultiNA (Shimadzu Corp.).

El nivel de polinucleótido de la banda que muestra que el exón 50 se saltó (el nivel de polinucleótido "A") y el nivel de polinucleótido de la banda que muestra que el exón 50 no se saltó (el nivel de polinucleótido "B") se midieron como intensidades de señal de las bandas. Con base en estos valores de medición de "A" y "B", la eficiencia de salto se determinó por la ecuación (1) mencionada anteriormente.

(2) Resultados de prueba

[00101] Las figuras 1 a 3 muestran los resultados sobre la eficiencia de salto de exón 50 obtenida con respecto a cada oligómero antisentido. Las tablas 2 a 4 a continuación muestran el valor de una concentración efectiva (EC₅₀) en la que cada oligómero antisentido exhibe eficiencia de salto ES de 50%, que se calculó a partir de estos resultados. Esta prueba reveló que los PMO No. 1 a 4 entre los oligómeros antisentido tenían una alta eficiencia de salto ES y un valor de EC₅₀ bajo y, por lo tanto,

provocaron efectivamente el salto de exón 50.

Entre los oligómeros antisentido con una longitud completa tan corta como 19 mero, como en los PMO No. 3 y 4, los PMO No. 5 a 7 tenían una baja eficiencia de salto y un alto valor de EC₅₀. El grado de traslape también es grande entre las secuencias de bases dirigidas por los PMO No. 3 y 4 y los PMO No. 5 a 7. Por lo tanto, la efectividad de los PMO No. 3 y 4 para el salto de exón 50 es notable.

Estos resultados demostraron que el oligómero antisentido de la presente invención, incluso si su longitud es corta en comparación a la técnica anterior, puede inducir el salto de exón 50 con alta eficiencia.

Tabla 3

Tabla 2, EC₅₀ de oligómeros antisentido (PMO No. 1 y 2)

PMO No.	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)
1	0.45	3.12
2	0.49	3.22

Tabla 4

Tabla 3, EC₅₀ de oligómeros antisentido (PMO No. 1, 3, y 4)

PMO No.	EC ₅₀ (μg/mL)	EC ₅₀ (μg/mL)
1	0.31	2.16
3	0.45	2.82
4	0.52	3.28

Tabla 5

Tabla 4, EC₅₀ de oligómeros antisentido (PMO No. 1, 5, 6 y 7)

PMO No.	EC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μg/mL)
1	0.41	2.87
5	16.08	100.99
6	3.13	9.78
7	1.23	7.75

Ejemplo 3: Prueba de solubilidad del oligómero antisentido

Prueba de solubilidad del oligómero antisentido en solución salina fisiológica

[00102] Entre los oligómeros antisentido con alta eficiencia de salto ES en el ejemplo 2, cada oligómero antisentido de PMO No. 2, 3, y 4 que tenía una longitud completa tan corta como 19 a 20 mero y se sintetizó convenientemente se probó para determinar su solubilidad en solución salina fisiológica a fin de verificar adicionalmente la utilidad para la aplicación médica.

(1) Método de prueba

[00103] Se adicionaron 45 μL de solución salina fisiológica a una botella de muestra que contenía 4.5 mg de cada oligómero antisentido anterior y se agitó usando ondas ultrasónicas y vórtice para preparar una solución salina fisiológica de 100 mg/mL. Una secuencia que no provocó precipitación cuando se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas se evaluó como que tenía alta solubilidad.

(2) Resultados de prueba

[00104] Todos los oligómeros antisentido probados exhibieron solubilidad igual o más alta que 100 mg/mL en solución salina fisiológica. Estos oligómeros antisentido son oligómeros antisentido altamente útiles como medicamentos debido a su alta eficiencia de salto de exón 50, así como alta solubilidad en solución salina fisiológica.

Estos resultados demostraron que el oligómero antisentido de la presente invención tiene excelentes propiedades físicas como medicamentos en tanto que se mantiene una actividad para inducir el salto de exón 50 en el gen de distrofina con alta eficiencia.

Aplicación Industrial

[00105] Los resultados experimentales en ejemplos de prueba demostraron que los oligómeros antisentido de la presente invención indujeron el salto de exón 50 con eficiencia marcadamente alta en células RD. Por lo tanto, los oligómeros antisentido de la presente invención son extremadamente útiles para el tratamiento de DMD.

Texto libre de listado de secuencias

[00106] SEQ ID NO: 1 a 10: ácidos nucleicos sintéticos