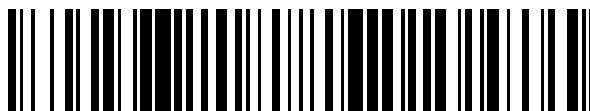


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 049**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.09.2016 PCT/JP2016/077305**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17047707**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2016 E 16846578 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3351633**

54 Título: **Ácido nucleico antisentido**

30 Prioridad:

15.09.2015 JP 2015182145

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.02.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ENYA, YUKIKO;
TONE, YUICHIRO;
TAKEDA, SHIN'ICHI y
AOKI, YOSHITSUGU

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 808 049 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Ácido nucleico antisentido

Campo técnico

La presente invención se refiere a un oligonucleótido antisentido que permite la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano, y a una composición farmacéutica que comprende dicho oligómero.

Antecedentes de la técnica

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es una miopatía progresiva hereditaria, cuya mayor incidencia aparece con una frecuencia de aproximadamente uno en 3.500 nacimientos masculinos vivos. En su infancia, los pacientes con DMD muestran casi la misma función motora que los seres humanos normales, pero muestran señales de debilidad muscular aproximadamente a la edad de 4 a 5 años. Después, esta debilidad muscular avanza hacia la pérdida de la ambulación hasta la edad de aproximadamente 12 años y, finalmente, conduce a la muerte en la veintena debido a insuficiencia cardíaca o insuficiencia respiratoria. La DMD es una enfermedad grave. En la actualidad no existe una terapia eficaz para la DMD y, por tanto, es muy necesario el desarrollo de un nuevo agente terapéutico.

Se sabe que la DMD está provocada por mutaciones en el gen de distrofina. El gen de distrofina está localizado en el cromosoma X y es un gen enorme que consiste en 2,2 millones de pares de nucleótidos de ADN. Este ADN se transcribe en un ARNm precursor y después se corta y empalma para eliminar intrones, produciendo con ello un ARNm que consiste en 79 exones unidos entre sí, que tiene una longitud de 13.993 bases. Este ARNm se traduce en 3.685 aminoácidos para producir una proteína de distrofina. La proteína de distrofina está implicada en el mantenimiento de la estabilidad de membrana de células musculares y es necesaria para que las células musculares sean menos propensas a romperse. Los pacientes con DMD tienen mutaciones en su gen de distrofina y, por tanto, casi no muestran expresión de una proteína de distrofina funcional en sus células musculares. Por esta razón, en el cuerpo de pacientes con DMD las células musculares ya no pueden conservar su estructura, y una abundancia de iones calcio fluyen hacia el interior de las células musculares. Como resultado, se produce una reacción similar a la inflamación para estimular la fibrosis, de modo que a las células musculares les resulta difícil regenerarse.

La distrofia muscular de Becker ("Becker muscular dystrophy", BMD) también está provocada por mutaciones en el gen de distrofina. Como síntoma, se observa debilidad muscular, pero habitualmente es más leve y avanza más lentamente que la DMD, de modo que la BMD se desarrolla en la etapa adulta en la mayoría de los casos. Las diferencias en los síntomas clínicos entre la DMD y la BMD parecen surgir de si las mutaciones alteran o mantienen el marco de lectura de aminoácidos durante la traducción a partir del ARNm de distrofina para producir una proteína de distrofina (documento que no es patente 1). Concretamente, los pacientes con DMD casi no muestran expresión de una proteína de distrofina funcional debido a que poseen mutaciones responsables para el desplazamiento del marco de lectura de aminoácidos, mientras que en pacientes con BMD, las mutaciones provocan la delección de algunos exones, pero el marco de lectura de aminoácidos se mantiene, de modo que se produce una proteína de distrofina incompleta, aunque funcional.

Como terapia para la DMD, la terapia de omisión de exones resulta prometedora. Esta terapia implica la modificación del corte y empalme para restablecer el marco de lectura de aminoácidos en el ARNm de distrofina, induciendo con ello la expresión de una proteína de distrofina con una función parcialmente recuperada (documento que no es patente 2). En esta terapia, las regiones de secuencia de aminoácidos que son la diana de la omisión de exones son delecionadas. Por esta razón, una proteína de distrofina expresada en esta terapia es más corta que la proteína normal, pero conserva parcialmente la función estabilizadora de las células musculares porque el marco de lectura de aminoácidos se mantiene. Por tanto, se espera que la omisión de exones provoque que la DMD presente los mismos síntomas observados en la BMD, que es más leve. En la actualidad, la terapia de omisión de exones está sometiéndose a ensayos clínicos en pacientes con DMD humanos después de haber realizado experimentos animales en ratones y perros.

La omisión de exones puede inducirse uniendo ácidos nucleicos antisentido dirigidos a cualquiera o ambos sitios de corte y empalme 5' y 3' o dirigidos a secuencias internas de exones. Un exón se incluye en el ARNm solo cuando sus dos sitios de corte y empalme son reconocidos por un complejo de espliceosoma. Por tanto, puede inducirse la omisión de exones cuando los sitios de corte y empalme son localizados por los ácidos nucleicos antisentido. Además, para inducir el reconocimiento de los exones por la maquinaria de corte y empalme, es necesario que proteínas SR ricas en serina y arginina se unan a potenciadores del corte y empalme de exones ("exon splicing enhancers", ESE) y, por tanto, la omisión de exones también puede inducirse tras la localización de los ESE.

Los pacientes con DMD presentan diferentes mutaciones en su gen de distrofina y, por tanto, son necesarios diversos ácidos nucleicos antisentido dependiendo de la posición y el tipo de mutación del gen. Existen algunos informes de un ácido nucleico antisentido diseñado para inducir la omisión de exones de un único exón en el gen de distrofina mediante la localización de una única secuencia continua (documentos de patente 1 a 6, así como documentos que no son patentes 1 y 2). Además, existe un informe que demuestra que cuando se permite que dos

ácidos nucleicos antisentido diferentes dirigidos contra el mismo exón en el gen de distrofina actúen mezclados (localización doble), la actividad de omisión puede potenciarse, en comparación a cuando cada ácido nucleico antisentido se emplea por sí solo (documento de patente 7).

- 5 Sin embargo, no existen informes que demuestren que ciertos ácidos nucleicos antisentido monocatenarios conectados dirigidos contra dos o más sitios en el mismo exón (es decir, ácido nucleico antisentido de tipo conectado) muestren actividad de omisión.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente:

- Documento de patente 1: W02004/048570
- 10 Documento de patente 2: W02009/139630
- Documento de patente 3: W02010/048586
- Documento de patente 4: US2010/0168212
- Documento de patente 5: W02011/057350
- Documento de patente 6: W02006/000057
- 15 Documento de patente 7: W02007/135105

Documentos que no son patentes:

Documento que no es patente 1: Annemieke Aartsma-Rus *et al.* (2002), *Neuromuscular Disorders*, 12:S71-S77.

Documento que no es patente 2: Wilton S. D., *et al.*, *Molecular Therapy*, 2007, 15, p. 1288-1296.

Sumario de la invención

20 *Problema que se va a solucionar mediante la invención*

Bajo las circunstancias descritas anteriormente, la presente invención se dirige, principalmente, a proporcionar un nuevo oligómero antisentido de tipo conectado que se diseña para inducir la omisión de exones mediante la localización separada de dos secuencias de nucleótidos en el mismo exón del gen de distrofina, y un agente terapéutico para la distrofia muscular que comprende dicho oligómero.

25 *Medios para resolver el problema*

- Como resultado de estudios detallados de los contenidos técnicos descritos en los anteriores documentos y de la estructura del gen de distrofina, etc., los inventores de la presente invención han descubierto que oligómeros dirigidos contra dos sitios distintos en el exón 45 del gen de distrofina humano se conectan entre sí y el oligómero antisentido resultante puede inducir la omisión de este exón. Los inventores de la presente invención han completado la presente invención basándose en este descubrimiento.
- 30

Concretamente, la presente invención es como sigue.

- [1] Un oligómero antisentido de 14 a 32 bases de longitud, que comprende dos unidades de oligómeros conectadas seleccionadas del grupo que consiste en (a) a (e) que aparecen a continuación, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, en el que las dos unidades de oligómeros no son contiguas entre sí ni se solapan entre sí:
- 35

(a) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones -5 a 15 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;

- (b) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 48 a 70 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;
- 40

(c) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 128 a 150 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;

- (d) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en
- 45

las posiciones 15 a 40 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano; y

(e) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 110 a 125 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano.

- 5 [2] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [1] anterior, en el que una de las dos unidades de oligómeros es (a).

[3] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [1] o [2] anteriores, que consiste en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:7 a 12, 14 a 33, 40 a 52, 57, 64, 65 y 79 a 86.

- 10 [4] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [1] o [3] anteriores, que consiste en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 10, 25, 30, 33, 79 y 80.

[5] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [1] a [4] anteriores, que es un oligonucleótido.

- 15 [6] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [5] anterior, en el que al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido se modifica en el resto azúcar y/o en el resto de enlace fosfato.

[7] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [5] o [6] anteriores, en el que el resto azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo -OH en la posición 2' está sustituido por cualquier grupo seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br y I (en las que R representa alquilo o arilo, y R' representa alquilenos).

[8] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [6] o [7] anteriores, en el que el resto de enlace fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforoamidato y un enlace boranofosfato.

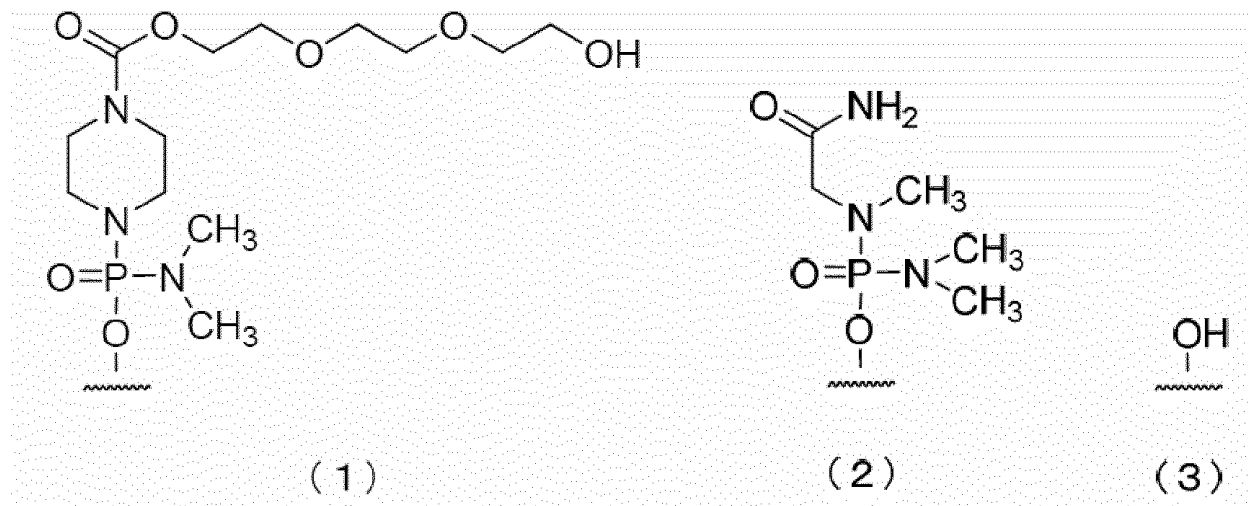
[9] El oligómero antisentido según uno cualquiera de [1] a [4] anteriores, que es un oligómero de morfolino, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos.

[10] El oligómero antisentido según [9] anterior, que es un oligómero de morfolino fosfordiamidato, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos.

- 30 [11] El oligómero antisentido según [4] anterior, que es un oligómero de morfolino fosforodiamidato, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos.

[12] El oligómero antisentido según uno cualquiera de [9] a [11] anteriores, cuyo extremo 5'-terminal es uno cualquiera de los grupos representados por las fórmulas químicas (1) a (3) mostradas a continuación, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos.

- 35 Fórmula 1



[13] Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende el oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según uno cualquiera de [1] a [12] anteriores, como ingrediente activo.

5 [14] La composición farmacéutica según [13] anterior, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[15] También se describe un método para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende la etapa de administrar, a un paciente con distrofia muscular, el oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según uno cualquiera de [1] a [12] anteriores, o la composición farmacéutica según [13] o [14] anteriores.

10 [16] El método de tratamiento según [15] anterior, en el que el paciente con distrofia muscular es un paciente que posee una mutación que es la diana de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina.

[17] El método de tratamiento según [15] o [16] anteriores, en el que el paciente es un paciente humano.

15 [18] La invención se refiere además al uso del oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según uno cualquiera de [1] a [12] anteriores, para la fabricación de una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular.

[19] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según uno cualquiera de [1] a [12] anteriores, para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular.

20 [20] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [19] anterior, en el que, en el tratamiento, un paciente con distrofia muscular posee una mutación que es la diana de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina.

[21] El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según [19] o [20] anteriores, en el que el paciente es un paciente humano.

Efectos de la invención

25 El oligómero antisentido de la presente invención permite una inducción eficaz de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano. Además, la composición farmacéutica de la presente invención, cuando se administra, permite un alivio eficaz de los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne. Los exones delecionados en los pacientes que se van a tratar incluyen los exones 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, etc.

Breve descripción de los dibujos

30 La figura 1 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 2 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 3 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

35 La figura 4 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 5 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

40 La figura 6 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 7 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 8 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

45 La figura 9 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 10 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 11 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 12 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

- 5 La figura 13 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 14 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

- 10 La figura 15 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 16 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 17 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

- 15 La figura 18 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 19 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

- 20 La figura 20 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 21 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 22 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

- 25 La figura 23 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

La figura 24 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

- 30 La figura 25 es una gráfica que muestra la eficacia de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano en células de rabdomiosarcoma humano (células RD).

Descripción de realizaciones

La presente invención se describirá con más detalle a continuación. Las siguientes realizaciones se ilustran para describir la presente invención, y no se pretende limitar la presente invención solo a estas realizaciones. La presente invención puede practicarse en diversos modos sin apartarse del espíritu de la presente invención.

- 35 Debe advertirse que todas las publicaciones citadas en la presente, incluyendo los documentos de la técnica anterior, las gacetas de patentes y otros documentos de patente, se incorporan en la presente como referencia. Además, esta memoria descriptiva incorpora el contenido descrito en la memoria descriptiva y los dibujos de la solicitud de patente japonesa n.º 2015-182145 (presentada el 15 de septiembre de 2015), en el que se basa la presente solicitud para reivindicar la prioridad.

- 40 1. Oligómero antisentido

La presente invención proporciona un oligómero antisentido que permite la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos (denominados de modo colectivo en la presente como "el oligómero de la presente invención").

Exón 45 en el gen de distrofina humano

- 45 En el contexto de la presente invención, el término "gen" pretende incluir no solo un gen genómico, sino también ADNc, ARNm precursor y ARNm. El gen es preferiblemente ARNm precursor, es decir, pre-ARNm.

En el genoma humano, el gen de distrofina humano se localiza en el locus Xp21.2. El gen de distrofina humano tiene un tamaño de 3,0 Mpb y es el gen más grande entre los genes humanos conocidos. Sin embargo, las regiones

codificadoras en el gen de distrofina humano constituyen solo 14 kb y están distribuidas a lo largo de 79 exones dentro del gen de distrofina (Roberts, R.G., *et al.*, Genomics, 16:536-538 (1993)). El pre-ARMm transcrito a partir del gen de distrofina humano se corta y empalma para generar un ARNm maduro de 14 kb. La secuencia de nucleótidos del gen de distrofina humano de tipo salvaje se conoce (n.º de registro de GenBank NM 004006).

La secuencia de nucleótidos del exón 45 en el gen de distrofina humano de tipo salvaje se muestra en SEQ ID NO:13. Además, en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:13) del exón 45 en el gen de distrofina humano de tipo salvaje, en la SEQ ID NO:3 se muestra una secuencia que consiste en las bases en las posiciones -5 a 15 contadas a partir del extremo 5'-terminal. De modo similar, en las SEQ ID NO:4 a 6 y 143, respectivamente, se muestra una secuencia que consiste en las bases en las posiciones 48 a 70, una secuencia que consiste en las bases en las posiciones 128 a 150, una secuencia que consiste en las bases en las posiciones 15 a 40, y una secuencia que consiste en las bases en las posiciones 110 a 125.

El oligómero de la presente invención se ha preparado para provocar la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano con el objetivo de modificar una proteína codificada por el gen de distrofina de DMD para producir una proteína de distrofina de BMD. Por tanto, el exón 45 en el gen de distrofina que va a ser omitido por el oligómero de la presente invención incluye no solo el tipo salvaje, sino también las formas mutadas.

De modo más específico, el exón 45 mutado en el gen de distrofina humano, o una de sus porciones, es un polinucleótido mostrado en (I) o (II) a continuación:

(I) un polinucleótido que puede hibridarse bajo condiciones rigurosas con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:143; o

(II) un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos que comparte una identidad del 90% o mayor con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:143.

Tal como se emplea en la presente, el término "polinucleótido" pretende indicar ADN o ARN.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "polinucleótido que puede hibridarse bajo condiciones rigurosas" pretende indicar, por ejemplo, un polinucleótido que puede obtenerse mediante hibridación de colonias, hibridación de placas, hibridación Southern u otras técnicas de hibridación, como una sonda, un polinucleótido entero o una parte de este que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:143. Para la hibridación, es posible usar técnicas como las descritas, por ejemplo, en "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, vol. 3, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 2001" y "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 1987-1997".

Tal como se emplea en la presente, la expresión "secuencia de nucleótidos complementaria" no se limita solo a una secuencia de nucleótidos que forma pares de Watson-Crick con una secuencia de nucleótidos diana, y también incluye secuencias de nucleótidos que forman pares de bases tambaleantes con una secuencia de nucleótidos diana. A este respecto, una par de Watson-Crick significa un par de bases que forman un enlace de hidrógeno entre adenina y timina, entre adenina y uracilo, o entre guanina y citosina, mientras que un par de bases tambaleantes significa un par de bases que forman un enlace de hidrógeno entre guanina y uracilo, entre inosina y uracilo, entre inosina y adenina, o entre inosina y citosina. Además, no es necesario que esta "secuencia de nucleótidos complementaria" tenga 100% de complementariedad con una secuencia de nucleótidos diana y puede contener bases no complementarias (por ejemplo, de 1 a 3 bases, 1 o 2 bases, o una sola base) con la secuencia de nucleótidos diana.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "condiciones rigurosas" puede referirse a cualquiera de condiciones de baja rigurosidad, condiciones moderadamente rigurosas y condiciones de alta rigurosidad. Las "condiciones de baja rigurosidad" se refieren, por ejemplo, a condiciones de 5 x SSC, 5 x disolución de Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% a 32 °C. De modo similar, "condiciones moderadamente rigurosas" se refieren, por ejemplo, a condiciones de 5 x SSC, 5 x disolución de Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% a 42 °C, o condiciones de 5 x SSC, SDS al 1%, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), formamida al 50% a 42 °C. Las "condiciones de alta rigurosidad" se refieren, por ejemplo, a condiciones de 5 x SSC, 5 x disolución de Denhardt, SDS al 0,5%, formamida al 50% a 50 °C, o condiciones de 0,2 x SSC, SDS al 0,1% SDS a 65 °C. Bajo estas condiciones, puede esperarse que un polinucleótido que presente una identidad mayor se obtenga con más eficacia a una temperatura mayor. Sin embargo, la rigurosidad de la hibridación se verá afectada por una pluralidad de factores, que incluyen la temperatura, la concentración de la sonda, la longitud de la sonda, la fuerza iónica, el tiempo de reacción, la concentración salina, etc. Los expertos en la técnica podrán lograr la misma rigurosidad seleccionando estos factores según sea apropiado.

Debe advertirse que si se emplean kits disponibles en el mercado para la hibridación, puede usarse un sistema de marcaje y detección directa Alkphos (GE Healthcare) para este fin, como ejemplo. En este caso, la hibridación puede lograrse según el protocolo incluido en el kit, es decir, después de incubar una membrana durante la noche con una

sonda marcada y tras lavar con un tampón de lavado primario que contiene SDS al 0,1% (en p/v) a 55 °C, puede detectarse el polinucleótido hibridado. Como alternativa, si se emplea un reactivo disponible en el mercado (por ejemplo, PCR Labeling Mix (Roche Diagnostics)) para el marcaje con digoxigenina (DIG) de una sonda durante la preparación de sondas basadas en una secuencia de nucleótidos completa, o parte de esa, complementaria con cualquier secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:143, o seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:143, puede usarse un kit de detección de ácidos nucleicos de DIG (Roche Diagnostics) para la detección de la hibridación.

Además de los listados anteriormente, otros polinucleótidos que pueden hibridarse incluyen polinucleótidos que comparten una identidad de 90% o mayor, 91% o mayor, 92% o mayor, 93% o mayor, 94% o mayor, 95% o mayor, 96% o mayor, 97% o mayor, 98% o mayor, 99% o mayor, 99,1% o mayor, 99,2% o mayor, 99,3% o mayor, 99,4% o mayor, 99,5% o mayor, 99,6% o mayor, 99,7% o mayor, 99,8% o mayor, o 99,9% o mayor, con una secuencia que consiste en cualquier polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:143, según se calcula mediante el programa informático de búsqueda de homologías BLAST usando los parámetros por defecto.

Debe advertirse que la identidad de las secuencias de nucleótidos puede determinarse usando el algoritmo de Karlin y Altschul, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268, 1990; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873, 1993). Basándose en el algoritmo de BLAST, se han desarrollado programas denominados BLASTN y BLASTX (Altschul S.F., *et al.*, J. Mol. Biol., 215:403, 1990). Si se usa BLASTN para el análisis de la secuencia de nucleótidos, los parámetros pueden ajustarse, por ejemplo, a una puntuación = 100 y una longitud de palabra = 12. Si se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden utilizarse los parámetros por defecto en cada programa.

En cierta realización, el oligómero de la presente invención es un oligómero antisentido de 14 a 32 bases de longitud, que comprende dos unidades de oligómeros conectadas seleccionadas del grupo que consiste en (a) a (e) que aparecen a continuación, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos:

(a) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones -5 a 15 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;

(b) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 48 a 70 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;

(c) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 128 a 150 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;

(d) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 15 a 40 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano; y

(e) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 110 a 125 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano.

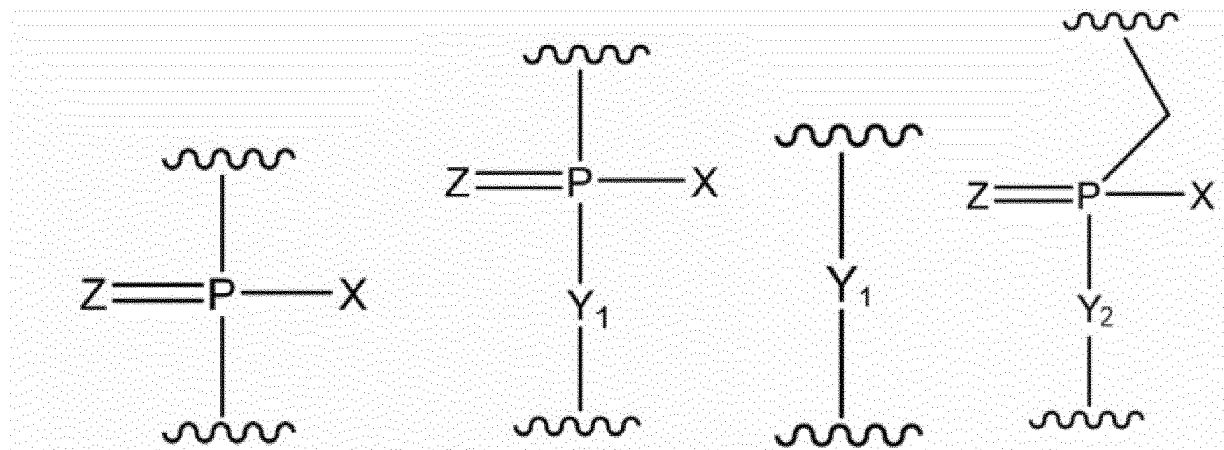
Las anteriores unidades de oligómeros (a) a (e) (en lo sucesivo, también se denominan simplemente "unidades") tienen cada una un tamaño de 7 a 16 bases de longitud, preferiblemente de 8 a 16 bases de longitud, más preferiblemente de 9 a 16 bases de longitud. Las respectivas unidades pueden tener el mismo tamaño o un tamaño diferente.

Además, cuando se seleccionan dos unidades de oligómeros del grupo que consiste en (a) a (e), estas dos unidades de oligómeros pueden ser una combinación de las mismas unidades (es decir, (a) y (a), (b) y (b), (c) y (c), (d) y (d), o (e) y (e)) o pueden ser una combinación de unidades diferentes, pero preferiblemente son una combinación de unidades diferentes. Por ejemplo, si se selecciona (a) como una unidad, la otra unidad es preferiblemente una cualquiera de (b) a (e). De modo similar, si se selecciona (b) como una unidad, la otra unidad es preferiblemente (a), (c), (d) o (e), mientras que si se selecciona (c) como una unidad, la otra unidad es preferiblemente (a), (b), (d) o (e).

Cuando dos unidades se seleccionan de (a) a (e), cualquiera de las dos unidades seleccionadas puede estar localizada en el lado 5'-terminal. Si se seleccionan (a) y (b), la unidad (a) está preferiblemente conectada al lado 3'-terminal. Si se seleccionan (b) y (c), la unidad (b) está preferiblemente conectada al lado 3'-terminal. Si se seleccionan (a) y (c), la unidad (a) está preferiblemente conectada al lado 3'-terminal. Si se seleccionan (a) y (d), la unidad (a) está preferiblemente conectada al lado 3'-terminal. Si se seleccionan (a) y (e), la unidad (a) está preferiblemente conectada al lado 3'-terminal.

Tal como se emplea en la presente, el término "conectado" significa que las dos unidades seleccionadas de (a) a (e) están directamente conectadas entre sí. Concretamente, cuando dos unidades están conectadas, esto significa que el extremo 3'-terminal de la unidad localizada en el lado 5'-terminal y el extremo 5'-terminal de la unidad localizada en el lado 3'-terminal forman un enlace fosfato o cualquiera de los siguientes grupos:

5 Fórmula 2



(en las que X representa -OH, -CH₂R¹, -O-CH₂R¹, -S-CH₂R¹, -NR₂R₃ o F;

R¹ representa H o alquilo;

R² y R³, que pueden ser iguales o diferentes, representan cada uno H, alquilo, cicloalquilo o arilo;

10 Y₁ representa O, S, CH₂ o NR¹;

Y₂ representa O, S o NR¹; y

Z representa O o S).

La expresión "que permite la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano" pretende indicar que, tras unir el oligómero de la presente invención a un sitio que se corresponde con el exón 45 en un transcrito (por ejemplo, pre-ARNm) del gen de distrofina humano, el transcrito se corta y empalma para establecer una conexión entre una base que se corresponde con el extremo 3'-terminal del exón 43 y una base que se corresponde con el extremo 5'-terminal del exón 46 en el caso de pacientes con DMD con la delección del exón 44, como ejemplo, para formar con ello un ARNm maduro sin desplazamiento de marco de codones.

El término "unión" se emplea en la presente para indicar que, tras haber mezclado el oligómero de la presente invención con un transcrito del gen de distrofina humano, ambos se hibridarán entre sí bajo condiciones fisiológicas para formar un dúplex. La expresión "bajo condiciones fisiológicas" se emplea para indicar condiciones ajustadas para imitar el pH, la composición salina y la temperatura *in vivo*, como, por ejemplo, unas condiciones de 25 °C a 40 °C, preferiblemente 37 °C, pH 5 a 8, preferiblemente pH 7,4, y una concentración de cloruro de sodio de 150 mM.

Para confirmar si se ha producido o no la omisión del exón 45 en el gen de distrofina humano, el oligómero de la presente invención puede transfectarse en células que expresan distrofina (por ejemplo, células de rabdomiosarcoma humanas) y puede amplificarse una región alrededor del exón 45 en el ARNm del gen de distrofina humano mediante RT-PCR a partir del ARN total de las anteriores células que expresan distrofina, seguido de una PCR anidada o de un análisis de secuenciación del producto de la amplificación de PCR. Puede determinarse la eficacia de la omisión como sigue: se recoge ARNm del gen de distrofina humano de las células ensayadas, y se mide el ARNm para el nivel del polinucleótido "A" en la banda con la omisión del exón 45 y el nivel del polinucleótido "B" en la banda sin omisión del exón 45, seguido de un cálculo basado en estos valores medidos de "A" y "B" según la siguiente ecuación.

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

El oligómero de la presente invención preferiblemente provoca la omisión del exón 45 con una eficacia de 10% o mayor, 20% o mayor, 30% o mayor, 40% o mayor, 50% o mayor, 60% o mayor, 70% o mayor, 80% o mayor, o 90% o mayor.

Para el cálculo de la eficacia de la omisión, puede remitirse al documento WO2012/029986.

El oligómero de la presente invención puede ejemplificarse mediante un oligonucleótido, un oligómero de morfolino o un oligómero de ácido nucleico peptídico (ANP), teniendo cada uno una longitud de 14 a 32 bases. El oligómero de la presente invención preferiblemente tiene una longitud de 16 a 30 bases, de 17 a 30 bases, de 18 a 30 bases, de 19 a 30 bases, de 20 a 30 bases, de 20 a 29 bases, de 20 a 28 bases, de 20 a 27 bases, de 20 a 26 bases, o de 21 a 26 bases, y preferiblemente es un oligómero de morfolino.

El anterior oligonucleótido (denominado en la presente "el oligonucleótido de la presente invención") es un oligómero según la presente invención, cuya unidad constituyente es un nucleótido, y dicho nucleótido puede ser cualquiera de un ribonucleótido, un desoxirribonucleótido o un nucleótido modificado.

Un nucleótido modificado se refiere a un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido cuya nucleobase, resto azúcar y resto de enlace fosfato están total o parcialmente modificados.

Los ejemplos de una nucleobase incluyen adenina, guanina, hipoxantina, citosina, timina, uracilo, o sus bases modificadas. Los ejemplos de estas bases modificadas pueden ser pseudouracilo, 3-metiluracilo, dihidouracilo, 5-alquilcitosinas (por ejemplo, 5-metilcitosina), 5-alquiluracilos (por ejemplo, 5-etiluracilo), 5-halouracilos (por ejemplo, 5-bromouracilo), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidinas (por ejemplo, 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 uracil-5-oxiacético, 2-tiocitosina, purina, 2,6-diaminopurina, 2-aminopurina, isoguanina, indol, imidazol, xantina, etc., pero no se limitan a estas.

Los ejemplos de modificaciones del resto azúcar pueden ser modificaciones en la posición 2' de la ribosa y modificaciones en otras posiciones del azúcar. Los ejemplos de modificaciones en la posición 2' de la ribosa incluyen modificaciones previstas para reemplazar el grupo -OH en la posición 2' de la ribosa por OR, R, R' OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br o I, en las que R representa alquilo o arilo, y R' representa alquileo.

Los ejemplos de modificaciones en otras posiciones del azúcar incluyen el reemplazo de O por S en la posición 4' de la ribosa o desoxirribosa, y la formación de un puente entre las posiciones 2' y 4' del azúcar, como ejemplifican los LNA ("locked nucleic acids", ácidos nucleicos bloqueados) o ENA (ácidos nucleicos con enlace 2'-O,4'-C-etileno), pero no se limitan a estos.

Los ejemplos de modificaciones en el resto de enlace fosfato pueden ser modificaciones previstas para reemplazar el enlace fosfodiéster por un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforoamidato o un enlace boranofosfato (Enya *et al.*, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2008, 18, 9154-9160) (véanse, por ejemplo, los documentos JP WO2006/129594 y JP WO2006/038608).

El alquilo es preferiblemente un alquilo lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. De modo más específico, los ejemplos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, n-butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo, terc-pentilo, n-hexilo y isohexilo. Este alquilo puede estar sustituido con 1 a 3 sustituyentes que incluyen halógeno, alcoxi, ciano, nitro, etc.

El cicloalquilo es preferiblemente un cicloalquilo que contiene de 5 a 12 átomos de carbono. De modo más específico, los ejemplos incluyen ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, ciclooctilo, ciclodecilo y ciclododecilo.

Los halógenos incluyen flúor, cloro, bromo y yodo.

El alcoxi puede ser un alcoxi lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono, cuyos ejemplos son metoxi, etoxi, n-propoxi, isopropoxi, n-butoxi, isobutoxi, sec-butoxi, terc-butoxi, n-pentiloxi, isopentiloxi, n-hexiloxi, isohexiloxi, etc. Se prefiere en particular un alcoxi que contiene de 1 a 3 átomos de carbono.

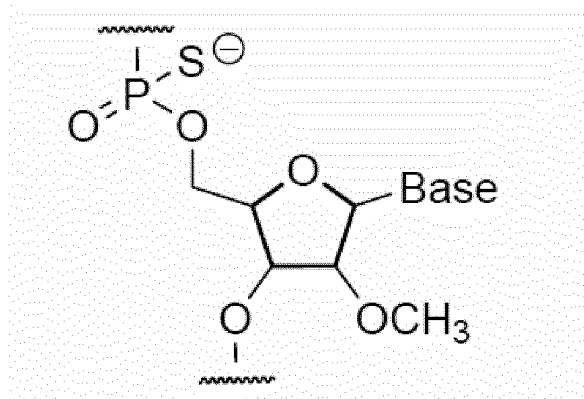
El arilo es preferiblemente un arilo que contiene de 6 a 10 átomos de carbono. De modo más específico, los ejemplos incluyen fenilo, α -naftilo y β -naftilo. Se prefiere en particular fenilo. Este arilo puede estar sustituido con 1 a 3 sustituyentes que incluyen alquilo, halógeno, alcoxi, ciano, nitro, etc.

El alquileo es preferiblemente un alquileo lineal o ramificado que contiene de 1 a 6 átomos de carbono. De modo más específico, los ejemplos incluyen metileno, etileno, trimetileno, tetrametileno, pentametileno, hexametileno, 2-(etil)trimetileno y 1-(metil)tetrametileno.

El acilo puede ser un aroilo o un alcanilo lineal o ramificado. Los ejemplos de dicho alcanilo incluyen formilo, acetilo, 2-metilacetilo, 2,2-dimetilacetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, pentanoilo, 2,2-dimetilpropionilo, hexanoilo, etc. Los ejemplos de un aroilo incluyen benzoilo, toluoilo y naftoilo. Este aroilo puede estar sustituido en cualquier posición sustituible y puede estar sustituido con uno o más alquilos.

El oligonucleótido de la presente invención es preferiblemente un oligómero según la presente invención, cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula general, en la que el grupo -OH en la posición 2' de la ribosa está sustituido con metoxi, y el resto de enlace fosfato es un enlace fosforotioato:

Fórmula 3

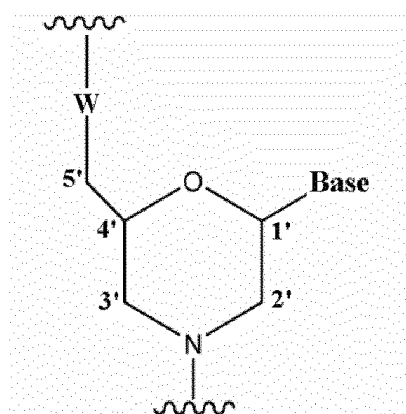


(en la que Base representa una nucleobase).

5 El oligonucleótido de la presente invención puede sintetizarse con facilidad con diversos sintetizadores automáticos (por ejemplo, AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)), o, como alternativa, su síntesis puede encargarse a terceras partes (por ejemplo, Promega o Takara), etc.

El anterior oligómero de morfolino es un oligómero según la presente invención, cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula general:

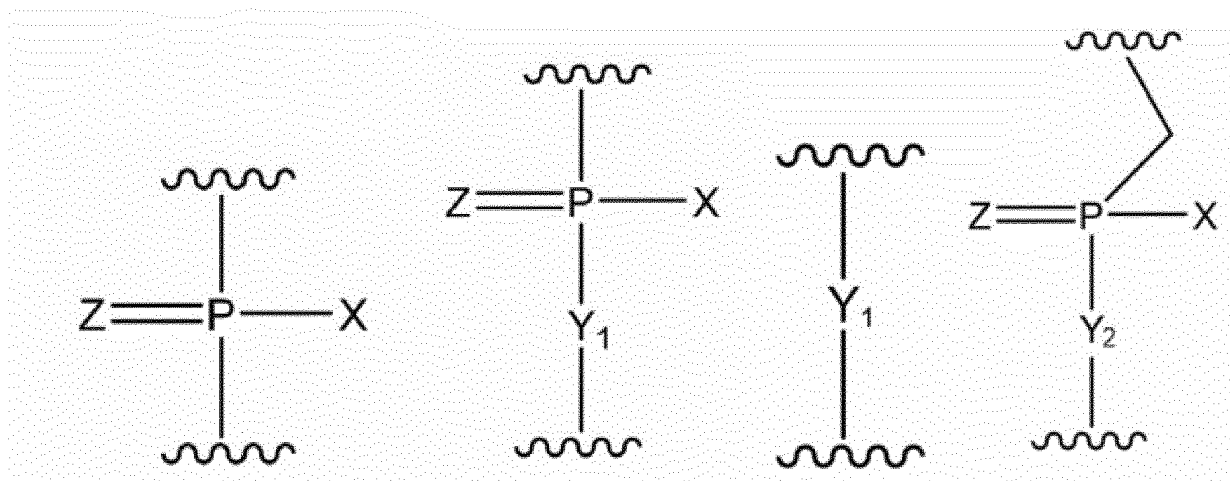
Fórmula 4



10

(en la que Base es como se definió anteriormente; y W representa un grupo mostrado en cualquiera de las siguientes fórmulas:

Fórmula 5



(en las que X representa $-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{O}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{S}-\text{CH}_2\text{R}^1$, $-\text{NR}_2\text{R}_3$ o F;

R^1 representa H o alquilo;

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

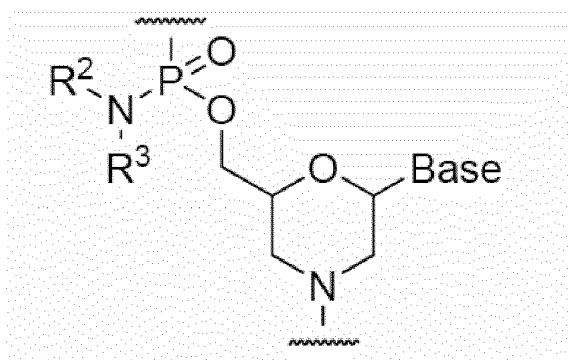
Y_1 representa O, S, CH_2 o NR^1 ;

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

Z representa O o S)).

El oligómero de morfolino es preferiblemente un oligómero cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula general (es decir, un oligómero de morfolino fosforodiamidato (denominado en lo sucesivo en la presente "PMO", "phosphorodiamidate morpholino oligomer")):

10 Fórmula 6



(en la que Base, R^2 y R^3 son como se definió anteriormente).

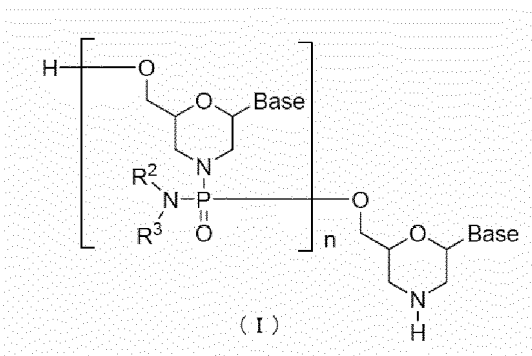
Por ejemplo, el oligómero de morfolino puede prepararse según el documento WO1991/009033 o el documento WO2009/064471. En particular, el PMO puede prepararse según los procedimientos descritos en el documento WO2009/064471 o puede prepararse según los procedimientos descritos en el documento WO2013/100190.

15

Proceso para la preparación de PMO

Como una realización del PMO, puede ofrecerse como ejemplo un compuesto representado por la siguiente fórmula general (I) (denominado en lo sucesivo en la presente PMO (I)):

Fórmula 7



20

[en la que cada Base, R^2 y R^3 son como se definió anteriormente; y n es cualquier número entero en el intervalo de 1 a 99, preferiblemente cualquier número entero en el intervalo de 13 a 31].

El PMO (I) puede prepararse según procedimientos conocidos, por ejemplo, realizando las operaciones mostrados en las siguientes etapas.

25

Los compuestos y los reactivos usados en las siguientes etapas no se limitan de ningún modo, siempre que se empleen habitualmente para la preparación de PMO.

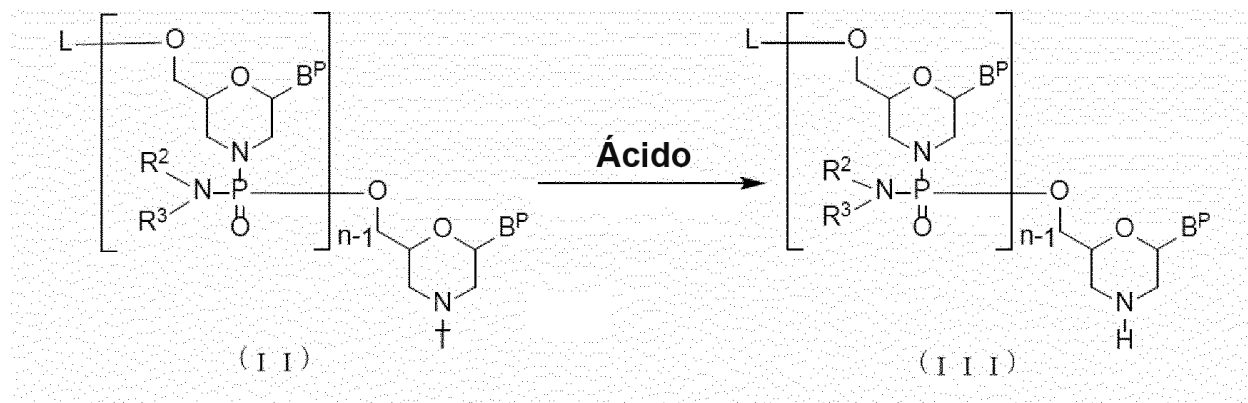
Además, todas las etapas siguientes pueden realizarse mediante el método en fase líquida o el método en fase

sólida (reacciones discontinuas repetidas o usando un sintetizador automático en fase sólida disponible en el mercado). Cuando el PMO se prepara mediante el método en fase sólida, resulta deseable usar un sintetizador automático, por su operación sencilla y síntesis precisa.

(1) Etapa A:

- 5 Esta es una etapa en la que un compuesto representado por la siguiente fórmula general (II) (denominada en lo sucesivo en el presente compuesto (II)) se trata con un ácido para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula general (III) (denominada en lo sucesivo en el presente compuesto (III)):

Fórmula 8



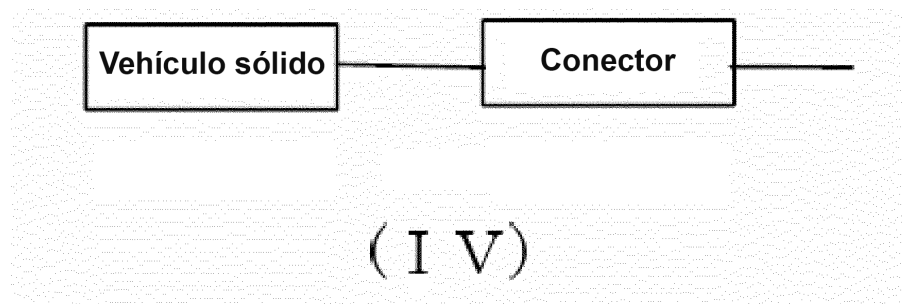
- 10 [en la que n, R² y R³ son como se definió anteriormente;

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

T representa un grupo tritilo, un grupo monometoxitritilo o un grupo dimetoxitritilo; y

L representa hidrógeno, acilo o un grupo representado por la siguiente fórmula general (IV) (denominada en lo sucesivo en la presente grupo (IV))]:

- 15 Fórmula 9



Las "nucleobases" posibles para B^P pueden ejemplificarse mediante las mismas "nucleobases" listadas para Base, con la condición de que los grupos amino o los grupos hidroxilo en estas nucleobases para B^P puedan protegerse.

- 20 Los grupos protectores para estos grupos amino no se limitan de ningún modo, siempre que se empleen como grupos protectores para ácidos nucleicos. De modo más específico, los ejemplos incluyen benzoílo, 4-metoxibenzoílo, acetilo, propionilo, butirilo, isobutirilo, fenilacetilo, fenoxiacetilo, 4-terc-butilfenoxiacetilo, 4-isopropilfenoxiacetilo, y (dimetilamino)metileno. Los grupos protectores para grupos hidroxilo incluyen, por ejemplo, 2-cianoetilo, 4-nitrofenetilo, fenilsulfoniletilo, metilsulfoniletilo, trimetilsililetilo, fenilo que puede estar sustituido con 1 a 5 grupos sustractores de electrones en cualquier posición o posiciones sustituibles, difenilcarbamoílo, dimetilcarbamoílo, dietilcarbamoílo, metilfenilcarbamoílo, 1-pirrolidinilcarbamoílo, morfolinocarbamoílo, 4-(terc-butilcarboxi)bencilo, 4-[(dimetilamino)carboxi]bencilo, y 4-(fenilcarboxi)bencilo (véase, por ejemplo, el documento WO2009/064471).

- 30 El "vehículo sólido" no se limita de ningún modo, siempre que sea un vehículo disponible para su uso en la reacción en fase sólida de ácidos nucleicos, pero resulta deseable usar, por ejemplo, un vehículo que (i) sea apenas soluble en reactivos disponibles para su uso en la síntesis de derivados de ácidos nucleicos de morfolino (por ejemplo, diclorometano, acetonitrilo, tetrazol, N-metilimidazol, piridina, anhídrido acético, lutidina, ácido trifluoroacético), (ii)

sea químicamente estable frente a los reactivos disponibles para su uso en la síntesis de derivados de ácidos nucleicos de morfolino, (iii) pueda modificarse químicamente, (iv) pueda cargarse con derivados de ácidos nucleicos de morfolino deseados, (v) tenga la fuerza suficiente para aguantar una alta presión durante el procesamiento, y (vi) tenga un cierto intervalo de tamaño de partícula y distribución. De modo más específico, los ejemplos incluyen poliestireno que puede hincharse (por ejemplo, una resina de aminometil poliestireno reticulada con divinilbenceno al 1% (de malla 200 a 400) (de 2,4 a 3,0 mmol/g) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Japón), resina de poliestireno aminometilada HCl [divinilbenceno al 1%, de malla 100 a 200] (Peptide Institute, Inc., Japón)), poliestireno que no se hincha (por ejemplo, Primer Support (GE Healthcare)), poliestirenos unidos a cadenas de PEG (por ejemplo, resina de NH₂-PEG (Watanabe Chemical Industries, Ltd., Japón), resina TentaGel), vidrio de tamaño de poro controlado ("controlled pore glass", CPG) (por ejemplo, CPG Inc.), vidrio de tamaño de poro controlado oxalilado (véase, por ejemplo, Alul *et al.*, Nucleic Acids Research, vol. 19, 1527 (1991)), soporte derivatizado con aminopolietilenglicol TentaGel (véase, por ejemplo, Wright *et al.*, Tetrahedron Letters, vol. 34, 3373 (1993)), y un copolímero de Poros-poliestireno/divinilbenceno.

Como "conector", es posible usar un conector conocido que se emplea habitualmente para conectar un ácido nucleico o un derivado de ácido nucleico de morfolino, y los ejemplos incluyen 3-aminopropilo, succinilo, 2,2'-dianilsulfonilo, y un alquilamino de cadena larga ("long-chain alkylamino", LCAA).

Esta etapa puede realizarse tratando el compuesto (II) con un ácido.

Los ejemplos de un "ácido" disponible para su uso en esta etapa incluyen ácido trifluoroacético, ácido dicloroacético o ácido tricloroacético. La cantidad de un ácido que se va a usar, por ejemplo, estará razonablemente en el intervalo de 0,1 equivalentes molares a 1000 equivalentes molares, preferiblemente en el intervalo de 1 equivalente molar a 100 equivalentes molares, con relación a 1 mol de compuesto (II).

Además, es posible utilizar una amina orgánica junto con el anterior ácido. Puede usarse cualquier amina orgánica para este fin, y los ejemplos incluyen trietilamina. La cantidad de amina orgánica que se va a usar, por ejemplo, estará razonablemente en el intervalo de 0,01 equivalentes molares a 10 equivalentes molares, preferiblemente en el intervalo de 0,1 equivalentes molares a 2 equivalentes molares, con relación a 1 mol del ácido.

En el caso en que se emplee un ácido y una amina orgánica como sal o mezcla en esta etapa, los ejemplos incluyen una sal o mezcla de ácido trifluoroacético y trietilamina, más específicamente una mezcla que contiene 2 equivalentes de ácido trifluoroacético y 1 equivalente de trietilamina.

Puede usarse un ácido disponible para su uso en esta etapa que se diluye con un disolvente apropiado para obtener una concentración en el intervalo del 0,1% al 30%. Puede utilizarse cualquier disolvente para este fin, con la condición de que sea inerte a la reacción, y los ejemplos incluyen diclorometano, acetonitrilo, alcoholes (por ejemplo, etanol, isopropanol, trifluoroetanol), agua, o sus mezclas.

La temperatura de reacción en la anterior reacción, por ejemplo, está preferiblemente en el intervalo de 10 °C a 50 °C, más preferiblemente en el intervalo de 20 °C a 40 °C, y aún más preferiblemente en el intervalo de 25 °C a 35 °C.

El tiempo de reacción variará dependiendo del tipo de ácido que se vaya a usar y/o la temperatura de reacción, pero en general estará razonablemente en el intervalo de 0,1 minutos a 24 horas, y preferiblemente en el intervalo de 1 minuto a 5 horas.

Además, después de completar esta etapa, puede añadirse una base opcionalmente para neutralizar el ácido remanente en el sistema. Puede usarse cualquier "base" para este fin, y los ejemplos incluyen diisopropiletilamina. Esta base puede usarse diluida con un disolvente apropiado para obtener una concentración en el intervalo del 0,1% (en v/v) al 30% (en v/v).

Puede utilizarse cualquier disolvente para este fin, con la condición de que sea inerte a la reacción, y los ejemplos incluyen diclorometano, acetonitrilo, alcoholes (por ejemplo, etanol, isopropanol, trifluoroetanol), agua, o sus mezclas. La temperatura de reacción, por ejemplo, está preferiblemente en el intervalo de 10 °C a 50 °C, más preferiblemente en el intervalo de 20 °C a 40 °C, y aún más preferiblemente en el intervalo de 25 °C a 35 °C.

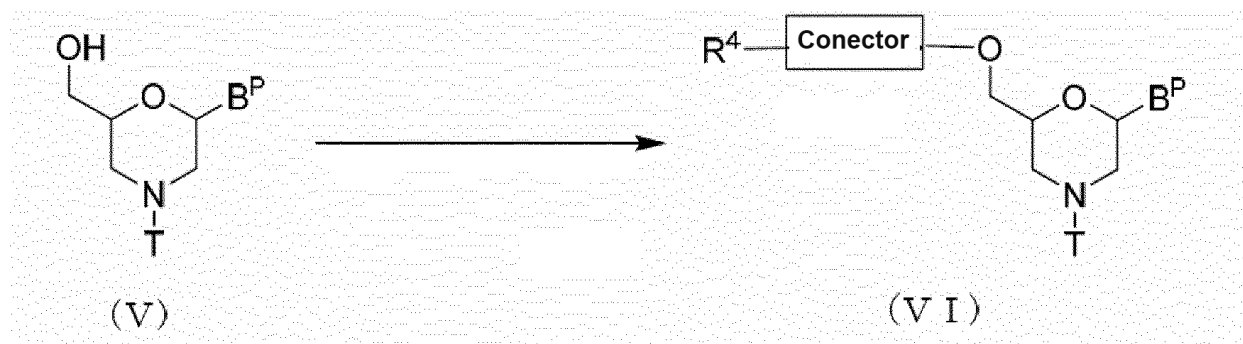
El tiempo de reacción variará dependiendo del tipo de base que se vaya a usar y/o la temperatura de reacción, pero en general estará razonablemente en el intervalo de 0,1 minutos a 24 horas, y preferiblemente en el intervalo de 1 minuto a 5 horas.

Debe advertirse que el compuesto (II), en el que n = 1 y L es un grupo (IV), es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIa) (denominada en lo sucesivo en la presente compuesto (IIa)) puede prepararse según los siguientes procedimientos:

Fórmula 10

5 Esta es una etapa en la que un compuesto representado por la siguiente fórmula general (V) se trata con un agente acilante para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VI) (denominada en lo sucesivo en la presente como compuesto (VI)):

Fórmula 11

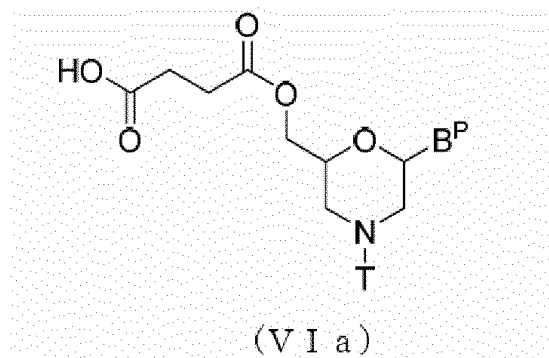


10 [en la que B^P, T y Conector son como se definió anteriormente; y R⁴ representa un grupo hidroxilo, halógeno o amino].

Esta etapa puede realizarse comenzando a partir del compuesto (V) mediante cualquier reacción conocida para la introducción de conectores.

En particular, puede prepararse un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VIa) mediante cualquier proceso conocido como reacción de esterificación con el uso del compuesto (V) y anhídrido succínico:

15 Fórmula 12

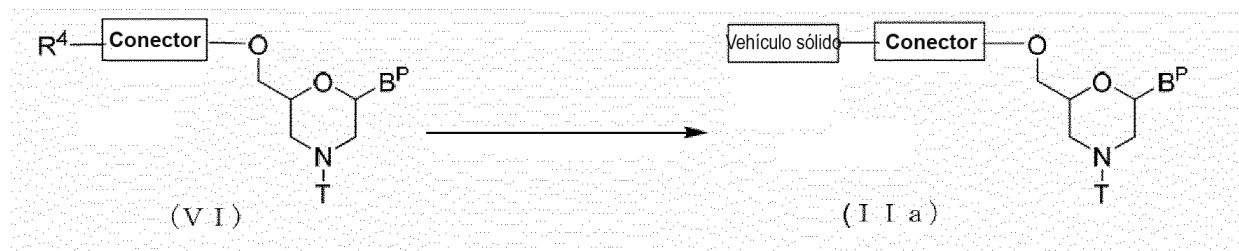


[en la que B^P y T son como se definió anteriormente].

Etapla 2:

Esta es una etapa en la que el compuesto (VI) se hace reaccionar con un vehículo sólido mediante un tratamiento con un agente condensante o similar para preparar el compuesto (IIa):

5 Fórmula 13

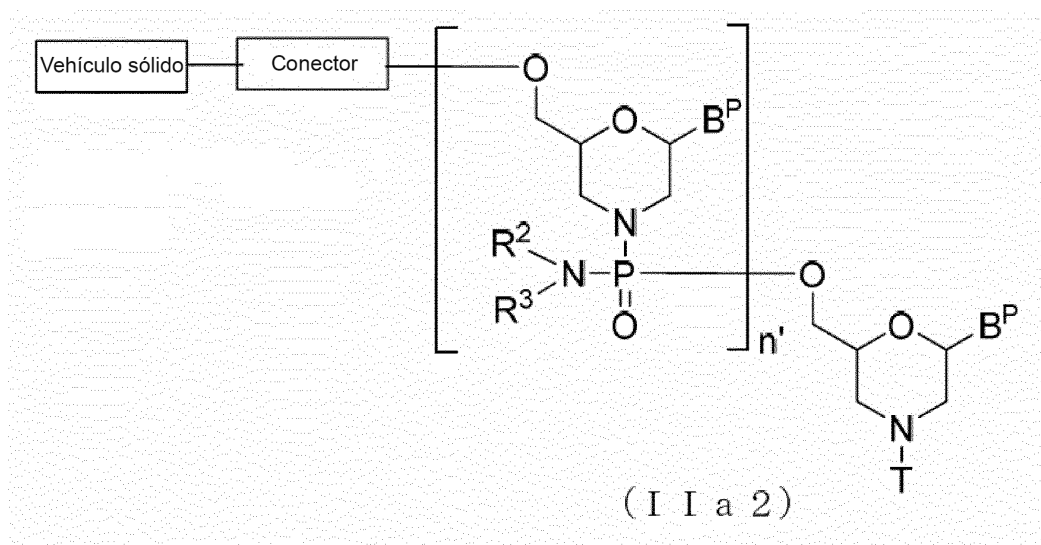


[en la que B^P, R⁴, T, Conector y Vehículo sólido son como se definió anteriormente].

Esta etapa puede realizarse según cualquier proceso conocido como reacción de condensación con el uso del compuesto (VI) y un vehículo sólido.

10 El compuesto (II), en el que n = 2 a 99 y L es un grupo (IV), es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIa2), puede prepararse comenzando a partir del compuesto (IIa) repitiendo las veces deseadas las etapas A y B del proceso para la preparación de PMO descrito en la presente:

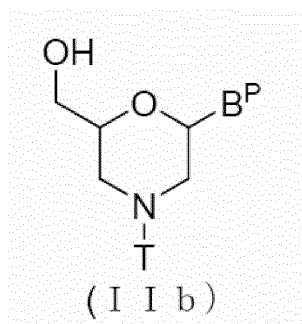
Fórmula 14



15 [en la que B^P, R², R³, T, Conector y Vehículo sólido son como se definió anteriormente; y n' representa de 1 a 98].

De modo similar, el compuesto (II), en el que n = 1 y L es hidrógeno, es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIb), puede prepararse, por ejemplo, mediante los procedimientos descritos en el documento WO1991/009033:

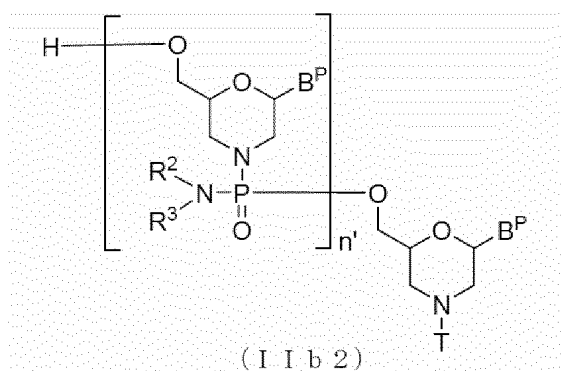
Fórmula 15



[en la que B^P y T son como se definió anteriormente].

- 5 El compuesto (II), en el que $n = 2$ a 99 y L es hidrógeno, es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIb2), puede prepararse comenzando a partir del compuesto (IIb) repitiendo las veces deseadas las etapas A y B del proceso para la preparación de PMO descrito en la presente:

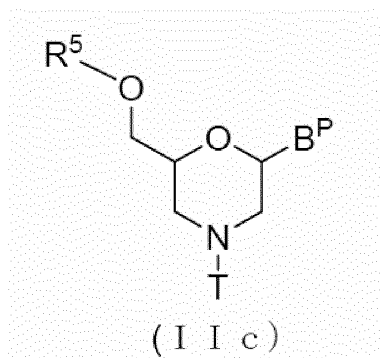
Fórmula 16



[en la que B^P , n' , R^2 , R^3 y T son como se definió anteriormente].

- 10 De modo similar, el compuesto (II), en el que $n = 1$ y L es acilo, es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIc), puede prepararse a partir del compuesto (IIb) mediante cualquier proceso conocido como reacción de acilación:

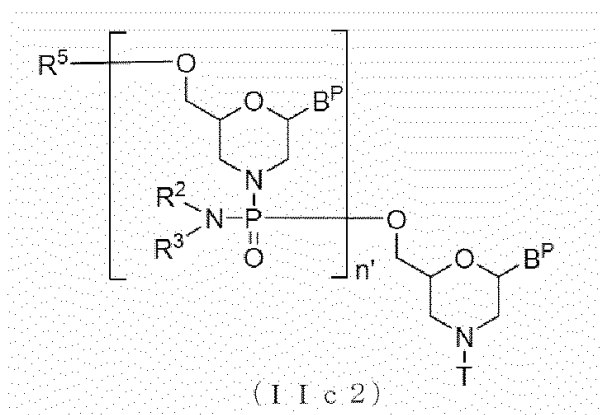
Fórmula 17



[en la que B^P y T son como se definió anteriormente; y R^5 representa acilo].

- 15 El compuesto (II), en el que $n = 2$ a 99 y L es acilo, es decir, un compuesto representado por la siguiente fórmula general (IIc2), puede prepararse comenzando a partir del compuesto (IIc) repitiendo las veces deseadas las etapas A y B del proceso para la preparación de PMO descrito en la presente:

Fórmula 18

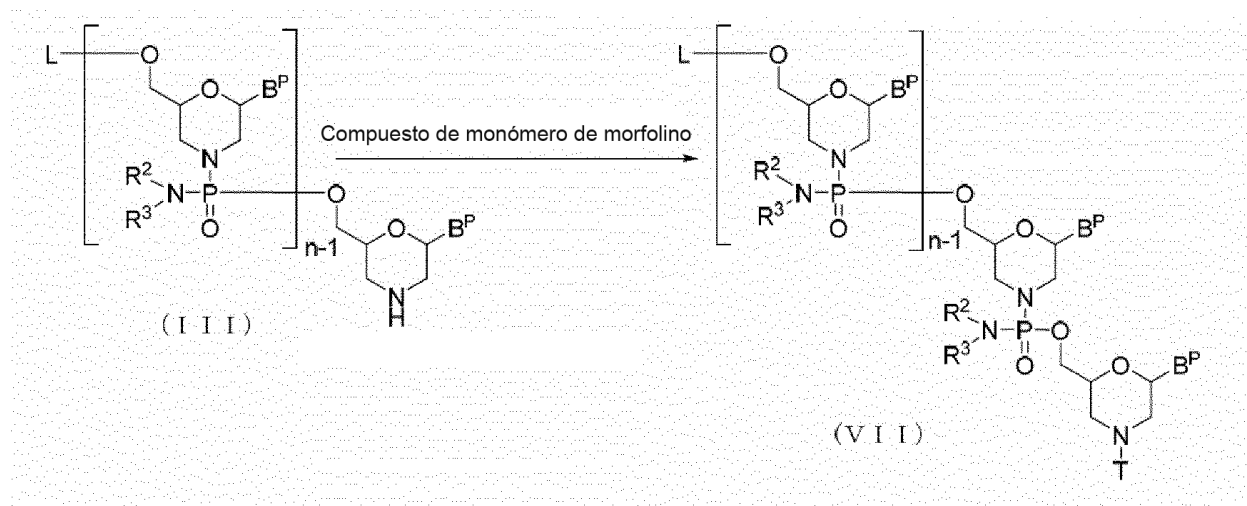


[en la que B^P , n' , R^2 , R^3 , R^5 y T son como se definió anteriormente].

(2) Etapa B:

- 5 Esta es una etapa en la que un compuesto (III) se trata con un compuesto de monómero de morfolino en presencia de una base para preparar un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VII) (denominada en lo sucesivo en la presente compuesto (VII)):

Fórmula 19

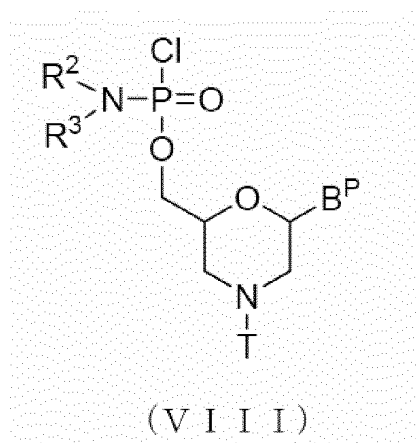


[en la que cada B^P , L , n , R^2 , R^3 y T son como se definió anteriormente].

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

Un ejemplo de dicho compuesto de monómero de morfolino puede ser un compuesto representado por la siguiente fórmula general (VIII):

Fórmula 20



[en la que B^P, R², R³ y T son como se definió anteriormente].

Los ejemplos de una "base" disponible para su uso en esta etapa incluyen diisopropiletilamina, trietilamina o N-etilmorfolina. La cantidad de una base que se va a usar, por ejemplo, estará razonablemente en el intervalo de 1 equivalente molar a 1000 equivalentes molares, preferiblemente en el intervalo de 10 equivalentes molares a 100 equivalentes molares, con relación a 1 mol de compuesto (III).

Este compuesto de monómero de morfolino y una base disponible para su uso en esta etapa pueden utilizarse diluidos con un disolvente apropiado para obtener una concentración del 0,1% al 30%. Puede utilizarse cualquier disolvente para este fin, con la condición de que sea inerte a la reacción, y los ejemplos incluyen N,N-dimetilimidazolidinona, N-metilpiperidona, DMF, diclorometano, acetonitrilo, tetrahidrofurano, o sus mezclas.

La temperatura de reacción, por ejemplo, está preferiblemente en el intervalo de 0 °C a 100 °C, y más preferiblemente en el intervalo de 10 °C a 50 °C.

El tiempo de reacción variará dependiendo del tipo de base que se vaya a usar y/o la temperatura de reacción, pero en general estará razonablemente en el intervalo de 1 minutos a 48 horas, y preferiblemente en el intervalo de 30 minutos a 24 horas.

Además, después de completar esta etapa, puede añadirse opcionalmente un agente acilante. Los ejemplos de un "agente acilante" incluyen anhídrido acético, cloruro de acetilo y anhídrido fenoxiacético. Este agente acilante puede usarse diluido con un disolvente apropiado para obtener una concentración en el intervalo del 0,1% al 30%, como ejemplo. Puede utilizarse cualquier disolvente para este fin, con la condición de que sea inerte a la reacción, y los ejemplos incluyen diclorometano, acetonitrilo, alcoholes (por ejemplo, etanol, isopropanol, trifluoroetanol), agua, o sus mezclas.

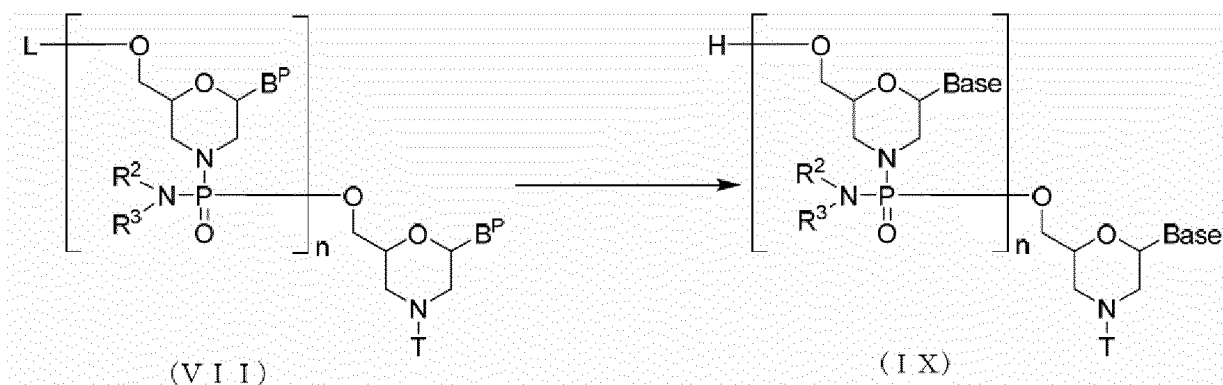
Si es necesario, es posible usar una base (por ejemplo, piridina, lutidina, colidina, trietilamina, diisopropiletilamina, N-etilmorfolina) junto con un agente acilante. La cantidad de un agente acilante que se va a usar está preferiblemente en el intervalo de 0,1 equivalentes molares a 10000 equivalentes molares, y más preferiblemente en el intervalo de 1 equivalente molar a 1000 equivalentes molares. La cantidad de una base que se va a usar, por ejemplo, estará razonablemente en el intervalo de 0,1 equivalentes molares a 100 equivalentes molares, preferiblemente en el intervalo de 1 equivalente molar a 10 equivalentes molares, con relación a 1 mol de un agente acilante.

La temperatura de reacción en esta reacción estará preferiblemente en el intervalo de 10 °C a 50 °C, más preferiblemente en el intervalo de 10 °C a 50 °C, aún más preferiblemente en el intervalo de 20 °C a 40 °C, y aún más preferiblemente en el intervalo de 25 °C a 35 °C. El tiempo de reacción variará, por ejemplo, dependiendo del tipo de agente acilante que se va a usar y/o la temperatura de reacción, pero en general estará razonablemente en el intervalo de 0,1 minutos a 24 horas, y preferiblemente en el intervalo de 1 minuto a 5 horas.

(3) Etapa C:

Esta es una etapa en la que se usa un agente desprotector para retirar los grupos protectores del compuesto (VII) preparado en la etapa B, preparando con ello un compuesto representado por la fórmula general (IX):

Fórmula 21



[en la que Base, B^P, L, n, R², R³ y T son como se definió anteriormente].

Esta etapa puede realizarse tratando el compuesto (VII) con un agente desprotector.

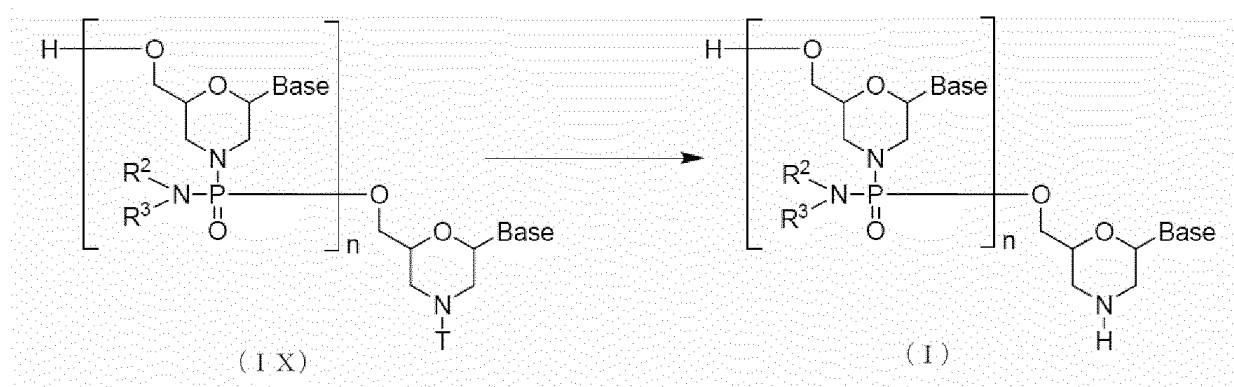
Los ejemplos de un "agente desprotector" incluyen amoníaco acuoso concentrado y metilamina. Este "agente desprotector" disponible para su uso en esta etapa puede emplearse diluido con agua, metanol, etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo, tetrahidrofurano, DMF, N,N-dimetilimidazolidinona, N-metilpiperidona, o un disolvente mixto de estos. Entre ellos, se prefiere el etanol. La cantidad de un agente desprotector que se va a usar, por ejemplo, estará razonablemente en el intervalo de 1 equivalente molar a 100000 equivalentes molares, preferiblemente en el intervalo de 10 equivalentes molares a 1000 equivalentes molares, con relación a 1 mol de compuesto (VII), como ejemplo.

La temperatura de reacción, por ejemplo, estará razonablemente en el intervalo de 15 °C a 75 °C, preferiblemente en el intervalo de 40 °C a 70 °C, y más preferiblemente en el intervalo de 50 °C a 60 °C. El tiempo de reacción para la desprotección variará dependiendo del tipo de compuesto (VII) y/o la temperatura de reacción, etc., pero estará razonablemente en el intervalo de 10 minutos a 30 horas, preferiblemente en el intervalo de 30 minutos a 24 horas, y más preferiblemente en el intervalo de 5 horas a 20 horas.

4) Etapa D:

Esta es una etapa en la que el compuesto (IX) preparado en la etapa C se trata con un ácido para preparar PMO (I):

Fórmula 22



[en la que Base, n, R², R³ y T son como se definió anteriormente].

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

Los ejemplos de un "ácido" disponible para su uso en esta etapa incluyen ácido tricloroacético, ácido dicloroacético, ácido acético, ácido fosfórico y ácido clorhídrico, etc. Con respecto a la cantidad de un ácido que se va a utilizar, resulta razonable emplear el ácido en una cantidad para obtener un pH de la disolución, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 4,0, más preferiblemente en el intervalo de 1,0 a 3,0. Puede usarse cualquier disolvente en esta etapa, con la condición de que sea inerte a la reacción, y los ejemplos incluyen acetonitrilo, agua, o disolventes mixtos de estos.

La temperatura de reacción estará preferiblemente en el intervalo de 10 °C a 50 °C, más preferiblemente en el intervalo de 20 °C a 40 °C, y aún más preferiblemente en el intervalo de 25 °C a 35 °C. El tiempo de reacción para la desprotección variará dependiendo del tipo de compuesto (IX) y/o la temperatura de reacción, etc., pero estará razonablemente en el intervalo de 0,1 minutos a 5 horas, preferiblemente en el intervalo de 1 minuto a 1 hora, y más

preferiblemente en el intervalo de 1 minuto a 30 minutos.

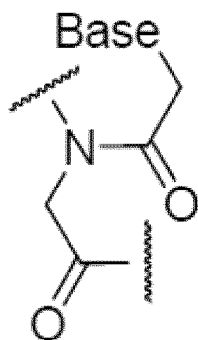
El PMO (I) puede obtenerse a partir de la mezcla de reacción obtenida en esta etapa mediante un medio de separación y purificación que se emplee habitualmente, que incluye extracción, concentración, neutralización, filtración, centrifugación, recristalización, cromatografía en columna de fase inversa C₈ a C₁₈, cromatografía en columna de intercambio catiónico, cromatografía en columna de intercambio aniónico, cromatografía en columna de filtración en gel, cromatografía líquida de alta resolución, diálisis, ultrafiltración y otros medios, que pueden usarse por sí solos o en combinación, con los cuales el PMO (I) deseado puede aislarse y purificarse (véase, por ejemplo, el documento WO1991/09033).

En el caso de usar una cromatografía en fase inversa para la purificación del PMO (I), puede emplearse una disolución mixta de tampón trietilamina 20 mM/acetato y acetonitrilo como disolvente de elución, como ejemplo.

De modo similar, en el caso de usar una cromatografía de intercambio iónico para la purificación del PMO (I), puede emplearse una disolución mixta de cloruro de sodio acuoso 1 M e hidróxido de sodio acuoso 10 mM, como ejemplo.

El anterior oligómero de ácido nucleico peptídico es un oligómero según la presente invención, cuya unidad constituyente es un grupo representado por la siguiente fórmula general:

Fórmula 23



(en la que Base es como se definió anteriormente).

Los ácidos nucleicos peptídicos pueden prepararse, preferiblemente, según los documentos listados a continuación.

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).

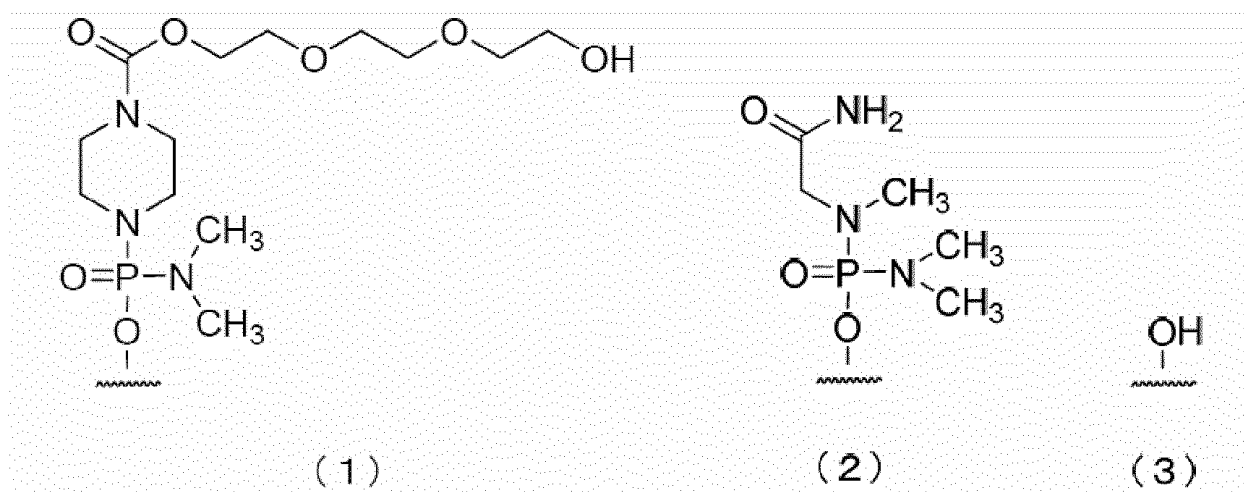
3) K. L. Dueholm, M. Egholm, C. Behrens, L. Christensen, H. F. Hansen, T. Vulpius, K. H. Petersen, R. H. Berg, P. E. Nielsen, O. Buchardt, J. Org. Chem., 59, 5767 (1994).

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).

Además, el oligómero de la presente invención puede configurarse de modo que su extremo 5'-terminal es uno cualquiera de los grupos representados por las fórmulas químicas (1) a (3) mostradas a continuación, prefiriéndose (3)-OH.

Fórmula 24



Los grupos representados por las anteriores fórmulas (1), (2) y (3) se denominan en la presente "grupo (1)", "grupo (2)" y "grupo (3)", respectivamente.

2. Composición farmacéutica

- 5 El oligómero de la presente invención permite la omisión del exón 45 en el gen de distrofina. Por tanto, se espera que los síntomas de la distrofia muscular puedan aliviarse cuando se administra una composición farmacéutica que comprende el oligómero de la presente invención a pacientes con DMD que poseen una mutación que es la diana de la omisión del exón 45 (es decir, una mutación se convierte en llama por la omisión del exón 45) en su gen de distrofina. Además, debido a su longitud corta de cadena, el oligómero de la presente invención resulta ventajoso, porque sus etapas de preparación son sencillas y además pueden reducirse los costes de su preparación.

Así, en otra realización, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende el oligómero de la presente invención, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, como ingrediente activo (denominada en lo sucesivo en la presente "la composición de la presente invención").

- 15 Los ejemplos de una sal farmacéuticamente aceptable del oligómero de la presente invención contenida en la composición de la presente invención incluyen sales de metales alcalinos (por ejemplo, sal de sodio, sal de potasio, sal de litio); sales de metales alcalinotérreos (por ejemplo, sal de calcio, sal de magnesio); sales metálicas (por ejemplo, sal de aluminio, sal de hierro, sal de cinc, sal de cobre, sal de níquel, sal de cobalto); sal de amonio; sales de aminas orgánicas (por ejemplo, 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'-dibenciletilendiamina, sal de cloroprocaína, sal de procaína, sal de dietanolamina, sal de N-bencil-fenetilamina, sal de piperazina, sal de tetrametilamonio, sal de tris(hidroximetil)aminometano); sales de hidroácidos halogenados (por ejemplo, sal fluorhidrato, sal clorhidrato, sal bromhidrato, sal yodhidrato); sales de ácidos inorgánicos (es decir, sal nitrato, sal perclorato, sal sulfato, sal fosfato); sales de ácidos alcansulfónicos inferiores (por ejemplo, sal metansulfonato, sal trifluorometansulfonato, sal etansulfonato); sales de ácido arilsulfónico (por ejemplo, sal bencensulfonato, sal p-toluensulfonato); sales de ácidos orgánicos (por ejemplo, sal acetato, sal malato, sal fumarato, sal succinato, sal citrato, sal tartrato, sal oxalato, sal maleato); sales de aminoácidos (por ejemplo, sal de glicina, sal de lisina, sal de arginina, sal de ornitina, sal glutamato, sal aspartato), etc. Estas sales pueden prepararse de cualquier manera conocida. Como alternativa, el oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención puede estar en forma de uno de sus hidratos.

- La composición de la presente invención puede administrarse en cualquier modo farmacéuticamente aceptable, que puede seleccionarse según sea apropiado para el método terapéutico previsto. Sin embargo, en términos de una administración fácil al tejido muscular, se prefiere la administración intravenosa, la administración intraarterial, la administración intramuscular, la administración subcutánea, la administración oral, la administración intersticial, la administración percutánea, etc. Además, la composición de la presente invención puede estar en cualquier forma de dosificación, y los ejemplos incluyen diversos tipos de inyecciones, formulaciones orales, gotas, inhalantes, ungüentos, lociones, etc.

- En el caso en que el oligómero de la presente invención se administre a pacientes con distrofia muscular, la composición de la presente invención preferiblemente comprende un vehículo que estimula el transporte del oligómero al tejido muscular. Este vehículo no se limita de ningún modo, siempre que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos incluyen vehículos catiónicos (por ejemplo, liposomas catiónicos, polímeros catiónicos) o

vehículos basados en una envuelta vírica. Los ejemplos de liposomas catiónicos incluyen liposomas formados a partir de 2-O-(2-dietilaminoetil)carbamoil-1,3-O-dioleoilglicerol y un fosfolípido como miembros constituyentes esenciales (denominados en lo sucesivo en la presente "liposoma A"), Oligofectamine (Invitrogen), Lipofectin (Invitrogen), Lipofectamine (Invitrogen), Lipofectamine 2000 (Invitrogen), DMRIE-C (Invitrogen), GeneSilencer (Gene Therapy Systems), TransMessenger (QIAGEN), TransIT TKO (Mirus) y Nucleofector II (Lonza). Entre estos, se prefiere el liposoma A. Los ejemplos de polímeros catiónicos incluyen JetST (Qbiogene) y Jet-PEI (polietilenimina, Qbiogene). Los ejemplos de vehículos basados en envueltas víricas incluyen GenomeOne (liposomas HVJ-E, Ishihara Sangyo Kaisha, Ltd., Japón). Como alternativa, también es posible usar el dispositivo farmacéutico mostrado en la patente japonesa n.º 2924179 o los vehículos catiónicos mostrados en los documentos JP WO2006/129594 y JP WO2008/096690.

La concentración del oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención variará, por ejemplo, dependiendo del tipo de vehículo, pero estará razonablemente en el intervalo de 0,1 nM a 100 µM, preferiblemente en el intervalo de 1 nM a 10 µM, y más preferiblemente en el intervalo de 10 nM a 1 µM. De modo similar, la proporción en peso del vehículo al oligómero de la presente invención contenido en la composición de la presente invención (es decir, la proporción de vehículo/oligómero) variará, por ejemplo, dependiendo de las propiedades del oligómero y el tipo de vehículo, pero estará razonablemente en el intervalo de 0,1 a 100, preferiblemente en el intervalo de 1 a 50, y más preferiblemente en el intervalo de 10 a 20.

La composición de la presente invención puede comprender opcionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable, además del oligómero de la presente invención y del vehículo descrito anteriormente. Los ejemplos de dicho aditivo incluyen un adyuvante emulgente (por ejemplo, un ácido graso que contiene de 6 a 22 átomos de carbono, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, albúmina, dextrano), un agente estabilizante (por ejemplo, colesterol, ácido fosfatídico), un agente isotonizante (por ejemplo, cloruro de sodio, glucosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa), y un ajustador de pH (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido acético, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, trietanolamina). Estos aditivos pueden usarse por sí solos o en combinación. El contenido del aditivo o aditivos en la composición de la presente invención será razonablemente del 90% en peso o menor, preferiblemente del 70% en peso o menor, y más preferiblemente del 50% en peso o menor.

La composición de la presente invención puede prepararse añadiendo el oligómero de la presente invención a una dispersión de un vehículo, seguido de una agitación adecuada. Pueden añadirse uno o más aditivos en cualquier etapa apropiada, tanto antes como después de añadir el oligómero de la presente invención. Puede usarse cualquier disolvente acuoso para añadir el oligómero de la presente invención, con la condición de que sea farmacéuticamente aceptable, y los ejemplos incluyen agua inyectable, agua destilada inyectable, disoluciones electrolíticas (por ejemplo, disolución salina fisiológica) y disoluciones de azúcares (por ejemplo, disolución de glucosa, disolución de maltosa). Además, en este caso, los expertos en la técnica pueden seleccionar condiciones que incluyan el pH y la temperatura apropiados.

La composición de la presente invención puede formularse en una disolución o una formulación liofilizada de esta, como ejemplo. Esta formulación liofilizada puede prepararse de una manera convencional liofilizando la composición de la presente invención en una forma en disolución. Por ejemplo, la composición de la presente invención en forma de disolución puede esterilizarse según sea apropiado y después dispensarse en cantidades concretas hacia botellas de viales, seguido de una congelación preliminar bajo condiciones de aproximadamente -40 °C a -20 °C durante aproximadamente 2 horas, un secado primario de aproximadamente 0 °C a 10 °C bajo presión reducida, y después un secado secundario de aproximadamente 15 °C a 25 °C bajo presión reducida. Además, en la mayoría de los casos, los viales pueden purgarse con un gas de nitrógeno y después cerrarse, proporcionando con ello una formulación liofilizada de la composición de la presente invención.

Esta formulación liofilizada de la composición de la presente invención puede usarse, en general, después de ser reconstituida mediante la adición de cualquier disolución apropiada (es decir, una disolución reconstituyente). Los ejemplos de dicha disolución reconstituyente incluyen agua inyectable, disolución salina fisiológica y otras disoluciones de infusión usadas habitualmente. El volumen de dicha disolución de reconstitución variará, por ejemplo, dependiendo del uso previsto y no está limitada de ninguna forma, pero será razonablemente de 0,5 a 2 veces mayor que el volumen de la disolución antes de la liofilización, o de 500 ml o menos.

La dosis para la administración de la composición de la presente invención se ajusta, de modo deseable, tomando en consideración el tipo de oligómero de la presente invención contenido en ella, la forma de dosificación prevista, la condición del paciente, tal como la edad y el peso corporal, la vía de administración y la naturaleza y gravedad de una enfermedad. Sin embargo, la dosis diaria para adultos en general estará en el intervalo de 0,1 mg a 10 g/humano, preferiblemente en el intervalo de 1 mg a 1 g/humano, calculados como la cantidad de oligómero de la presente invención. Este intervalo numérico puede variar dependiendo del tipo de enfermedad que se va a tratar, el modo de administración y/o del tipo de molécula diana. Por tanto, una dosis menor que este intervalo puede ser suficiente en algunos casos o, a la inversa, en algunos casos será necesaria una dosis mayor que este intervalo. Además, la composición de la presente invención puede administrarse de una a varias veces diarias o a intervalos de uno a varios días.

En otra realización, la composición de la presente invención puede ser una composición farmacéutica que comprende un vector capaz de expresar el oligonucleótido de la presente invención y un vehículo, según se describió anteriormente. Este vector de expresión puede ser capaz de expresar una pluralidad de oligonucleótidos según la presente invención. Esta composición puede comprender opcionalmente un aditivo farmacéuticamente aceptable, como en el caso de la composición de la presente invención que comprende el oligómero de la presente invención. La concentración del vector de expresión contenido en la composición variará, por ejemplo, dependiendo del tipo de vehículo, pero estará razonablemente en el intervalo de 0,1 nM a 100 µM, preferiblemente en el intervalo de 1 nM a 10 µM, y más preferiblemente en el intervalo de 10 nM a 1 µM. La proporción en peso del vehículo al vector de expresión contenido en la composición (es decir, la proporción de vehículo/vector de expresión) variará, por ejemplo, dependiendo de las propiedades del vector de expresión y el tipo de vehículo, pero estará razonablemente en el intervalo de 0,1 a 100, preferiblemente en el intervalo de 1 a 50, y más preferiblemente en el intervalo de 10 a 20. Además, el contenido del vehículo contenido en esta composición es igual que en el caso de la composición de la presente invención que comprende el oligómero de la presente invención, y los procedimientos para la preparación también son iguales que en el caso de la composición de la presente invención.

La presente invención se describe a continuación con más detalle por medio de los siguientes ejemplos ilustrativos y ejemplos de ensayo, aunque la presente invención no se limita a estos.

EJEMPLOS

Ejemplo de referencia 1: Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno

Etapas 1: Preparación del ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico

Bajo una atmósfera de argón, se suspendieron N-[1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il]benzamida (3,44 g) y 4-dimetilaminopiridina (4-DMAP) (1,1 g) en diclorometano (50 ml), y se añadió anhídrido succínico (0,90 g), seguido de una agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. La disolución de reacción se mezcló con metanol (10 ml) y se concentró a presión reducida. El residuo se extrajo con acetato de etilo y dibifosfato de potasio acuoso 0,5 M. La capa orgánica resultante se lavó secuencialmente con dibifosfato de potasio acuoso 0,5 M, agua y cloruro de sodio acuoso saturado. La capa orgánica resultante se secó sobre sulfato de sodio y se concentró a presión reducida para obtener 4,0 g del producto deseado.

Etapas 2: Preparación del ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno

El ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico (4,0 g) se disolvió en piridina (deshidratada) (200 ml), seguido de la adición de 4-DMAP (0,73 g) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (11,5 g). Después se añadió a esta mezcla la resina de aminopoliestireno Primer support 200 amino (GE Healthcare Japan, 17-5214-97) (25,0 g) y trietilamina (8,5 ml), seguido de una agitación a temperatura ambiente durante 4 días. Después de la reacción, la resina se recogió mediante filtración. La resina resultante se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano, y después se secó a presión reducida. A la resina resultante se le añadió tetrahidrofurano (deshidratado) (200 ml), anhídrido acético (15 ml) y 2,6-lutidina (15 ml), seguido de una agitación a temperatura ambiente durante 2 horas. La resina se recogió mediante filtración, se lavó secuencialmente con piridina, metanol y diclorometano, y después se secó a presión reducida para obtener 26,7 g del producto deseado.

Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, se midió la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina de una manera conocida, como la absorbancia de UV a 409 nm. Se descubrió que la cantidad de carga en la resina era de 129,2 µmol/g.

Condiciones para la medición de UV:

Instrumento: U-2910 (Hitachi, Ltd., Japón)

Disolvente: ácido metansulfónico

Longitud de onda: 409 nm

Valor de ε: 45000

Ejemplo de referencia 2: Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno

Se repitieron los mismos procedimientos mostrados en el ejemplo de referencia 1 para preparar el compuesto del título, excepto que la N-[1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il]benzamida usada en la etapa 1 del ejemplo de referencia 1 se reemplazó en esta etapa por 1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-5-metilpirimidin-2,4(1H,3H)-diona.

Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, se midió la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina de una manera conocida, como la absorbancia de UV a 409 nm. Se descubrió que la cantidad de carga en la resina era de 164,0 $\mu\text{mol/g}$.

- 5 Ejemplo de referencia 3: Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(6-benzamidopurin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno

Se repitieron los mismos procedimientos mostrados en el ejemplo de referencia 1 para preparar el compuesto del título, excepto que la N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida usada en la etapa 1 del ejemplo de referencia 1 se reemplazó en esta etapa por N-{9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]purin-6-il}benzamida.

- 10 Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, se midió la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina de una manera conocida, como la absorbancia de UV a 409 nm. Se descubrió que la cantidad de carga en la resina era de 185,7 $\mu\text{mol/g}$.

Ejemplo de referencia 4: Ácido 4-[[[(2S,6R)-6-{6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purin-9-il}-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno

- 15 Se repitieron los mismos procedimientos mostrados en el ejemplo de referencia 1 para preparar el compuesto del título, excepto que la N-{1-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]-2-oxo-1,2-dihidropirimidin-4-il}benzamida usada en la etapa 1 del ejemplo de referencia 1 se reemplazó en esta etapa por N-{6-(2-cianoetoxi)-9-[(2R,6S)-6-(hidroximetil)-4-tritilmorfolin-2-il]purin-2-il}-2-fenoxiacetamida.

- 20 Para determinar la cantidad de carga del producto deseado, se midió la cantidad molar de tritilo por gramo de la resina de una manera conocida, como la absorbancia de UV a 409 nm. Se descubrió que la cantidad de carga en la resina era de 164,8 $\mu\text{mol/g}$.

Según las descripciones en el ejemplo 1 mostrado a continuación, se sintetizaron los PMO que tienen las secuencias de nucleótidos de PMO n.^{os} 1 a 81 indicadas en la tabla 1 (en las que R² y R³ son cada uno metilo, y el extremo 5'-terminal es el grupo (3)). Los PMO sintetizados de este modo se disolvieron cada uno en agua para inyección (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Japón).

25

Tabla 1-1

PMO n.º	Secuencia de nucleótidos	Nombre de la secuencia	SEQ ID NO:
1	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_18-30	14
2	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_20-32	7
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_18-28	15
4	CCGCTGCCCAATGTCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_15-27	16
5	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11_18-30	17
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_21-31	18
7	TTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_20-31	19
8	TGCCGCTGCCCCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_19-29	20
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-10_21-32	8
10	CAGTTTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_20-34	9
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_19-34	10
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-12_20-32	21
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	H45_-2-8_21-34	22
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_23-35	23
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	H45_-2-7_20-34	24
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-32	25
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCTG	H45_-3-7_20-34	26
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTGT	H45_-4-8_15-27	27
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	H45_1-8_19-34	28
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_16-27	29
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_19-34	30
22	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCT	H45_-2-9_18-30	31
23	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCTGT	H45_-4-9_18-30	32
24	ACAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-35	33
25	GTTTGCCGCTGC	H45_21-32	34
26	CCTGGAGTTCCT	H45_-2-10	35
27	TGGAGTTCCT	H45_-2-8	36
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	H45_19-34	37
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	H45_2-14_53-65	38
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	H45_2-14_136-148	39
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-66	11
32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_135-149	12
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_136-147	40

Tabla 1-2

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_52-62	41
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_137-147	42
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-14_53-64	43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	H45_1-13_51-63	44
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_133-145	45

39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_134-146	46
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_55-67	47
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_138-150	48
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_52-66	49
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_50-61	50
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_52-66	51
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	H45_-2-13_52-64	52
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	H45_1-11_135-149	53
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_137-151	54
48	CTGTTTGCAGACCCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_144-156	55
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	H45_-5-8_141-153	56
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_128-142	57
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCCAAT	H45_16-30_132-146	58
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_98-110	59
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	H45_85-97_132-144	60
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-65_132-146	61
55	TGGCATCTGTTTTCATCCTGGAGTTC	H45_1-13_85-97	62
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCCTGTAAGA	H45_-8-5_58-70	63
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-15_114-123	64
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15_114-124	65
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	H45_129-143_156-170	66
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	H45_69-83_129-143	67
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTTT	H45_84-98_129-143	68
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCTGTAGAATA	H45_99-113_129-143	69
63	GCCATCCTGGAGTTC	H45_1-15	70
64	TTCTTCCCCAGTTGC	H45_52-66	71
65	CAGACCTCCTGCCAC	H45_135-149	72
66	TCCTGGAGTTCCT	H45_-2-11	73
67	GTTTGCCGCTGCC	H45_20-32	74
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCCAAT	H45_16-28_132-144	75

Tabla 1-3

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	H45_51-63_117-129	76
70	TGGAGTTCC	H45_-1-8	77
71	TGGAGTTC	H45_1-8	78
72	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_25-34	79
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	H45_-2-9_25-35	80
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	H45_-1-8_20-32	81
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	H45_-1-10_26-36	82
76	CAGTTTGCCGCCTGGAGTTC	H45_1-10_25-34	83
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-34	84
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTC	H45_1-11_24-33	85
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCT	H45_-1-9_25-35	86
80	TGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCC	H45_-1-11_18-29	87
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAATGC	H45_14-27_130-141	88
82	CCTGGAGTTCC	H45_-1-10	144
83	CAGTTTGCCG	H45_25-34	145
84	ACAGTTTGCCG	H45_25-35	146

Ejemplo 1

- 5 El ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(4-benzamido-2-oxopirimidin-1(2H)-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 1) o el ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(5-metil-2,4-dioxopirimidin-1-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 2) o el ácido 4-[[[(2S,6R)-6-(6-benzamidopurin-9-il)-4-tritilmorfolin-2-il]metoxi]-4-oxobutanoico cargado en una resina de

aminopoliestireno (ejemplo de referencia 3) o el ácido 4-{{(2S,6R)-6-{6-(2-cianoetoxi)-2-[(2-fenoxiacetil)amino]purin-9-il}-4-tritilmorfolin-2-il}metoxi}-4-oxobutanoico cargado en una resina de aminopoliestireno (ejemplo de referencia 4), cada uno correspondiente a la base 5'-terminal, se cargó en una cantidad de 0,2 g en una columna equipada con un filtro para iniciar los siguientes ciclos de síntesis usando un sintetizador de ácidos nucleicos (AKTA Oligopilot 10 plus). Para obtener la secuencia de nucleótidos de cada compuesto indicado en la tabla 1, se añadió un compuesto de monómero de morfolino deseado en cada ciclo de acoplamiento (véase la siguiente tabla 2).

Tabla 2

Etapas	Reactivo	Volumen (ml)	Tiempo (min)
1	Disolución de desbloqueo	18 a 32	1,8 a 3,2
2	Disolución de neutralización/lavado	30	1,5
3	Disolución de acoplamiento B	5	0,5
4	Disolución de acoplamiento A	1,3	0,25
5	Disolución de acoplamiento con los reactivos cargados en las etapas 3 y 4		120 a 300
6	Acetonitrilo	20	1,0
7	Disolución de bloqueo	9	2,0
8	Acetonitrilo	30	2,0

(Nota) Solo en el caso de la acetilación 3'-terminal, las etapas 1, 2, 7 y 8 se repitieron de nuevo después del ciclo final.

Debe advertirse que la disolución de desbloqueo usada fue una disolución de diclorometano que contenía ácido trifluoroacético al 3% (en p/v). La disolución de neutralización/lavado usada se preparó disolviendo N,N-diisopropiletilamina al 10% (en v/v) y tetrahidrofurano al 5% (en v/v) en una disolución de diclorometano que contenía acetonitrilo al 35% (en v/v). La disolución de acoplamiento A usada se preparó disolviendo un compuesto de monómero de morfolino a 0,10 M en tetrahidrofurano. La disolución de acoplamiento B usada se preparó disolviendo N,N-diisopropiletilamina al 20% (en v/v) y tetrahidrofurano al 10% (en v/v) en acetonitrilo. La disolución de bloqueo usada se preparó disolviendo anhídrido acético al 20% (en v/v) y 2,6-lutidina al 30% (en v/v) en acetonitrilo.

La resina de aminopoliestireno cargada con PMO sintetizado como se indicó anteriormente se recogió del recipiente de reacción y se secó a temperatura ambiente durante 2 horas o más a presión reducida. El PMO secado cargado en la resina de aminopoliestireno se cargó en un recipiente de reacción y se añadieron 5 ml de amoniaco acuoso al 28%-etanol (1/4), seguido de una agitación a 55 °C durante 15 horas. La resina de aminopoliestireno se separó mediante filtración y se lavó con 1 ml de agua-etanol (1/4). El filtrado resultante se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en 10 ml de un disolvente mixto que contiene tampón ácido acético 20 mM-trietilamina (tampón TEAA) y acetonitrilo (4/1), y después se filtró a través de un filtro de membrana. El filtrado resultante se purificó mediante HPLC en fase inversa. Las condiciones usadas se indican en la siguiente tabla 3.

Tabla 3

Columna	XBridge 5 µm C18 (Waters, Φ19 x 50 mm, 1 VC = 14 ml)
Caudal	10 ml/minuto
Temperatura de la columna	temperatura ambiente
Disolución A	tampón TEAA 20 mM
Disolución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 10% --> 70%/15 VC

CV: volumen de columna

Las fracciones se analizaron cada una para recoger el producto deseado, que después se concentró a presión reducida. El residuo concentrado se diluyó con ácido fosfórico acuoso 2 M (0,5 ml) y se agitó durante 15 minutos. Además, el residuo se hizo alcalino con hidróxido de sodio acuoso 2 M (2 ml) y se filtró a través de un filtro de membrana (0,45 µm).

La disolución acuosa resultante que contenía el producto deseado se purificó a través de una columna de resina de intercambio aniónico. Las condiciones usadas se indican en la siguiente tabla 4.

Tabla 4

Columna	Source 15Q (GE Healthcare, $\Phi 10 \times 108$ mm, 1 VC = 8,5 ml)
Caudal	8,5 ml/min
Temperatura de la columna	temperatura ambiente
Disolución A	hidróxido de sodio acuoso 10 mM
Disolución B	hidróxido de sodio acuoso 10 mM, cloruro de sodio acuoso 1 M
Gradiente	(B) conc. 1% -> 50%/40 VC

- 5 Las fracciones se analizaron cada una (mediante HPLC) para obtener el producto deseado como una disolución acuosa. La disolución acuosa resultante se neutralizó con tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0) y después se desaló mediante HPLC en fase inversa bajo las condiciones indicadas en la siguiente tabla 5.

Tabla 5

Columna	XBridge 5 m C8 (Waters, $\Phi 10 \times 50$ mm, 1 VC = 4 ml)
Caudal	4 ml/minuto
Temperatura de la columna	60 °C
Disolución A	agua
Disolución B	CH ₃ CN
Gradiente	(B) conc. 0% -> 50%/20 VC

- 10 El producto deseado se recogió y se concentró a presión reducida. El residuo resultante se disolvió en agua y se liofilizó para obtener el compuesto deseado como un sólido flocculento blanco. Los valores calculados y medidos de EST-TOF-MS se muestran en la tabla 6.

Tabla 6-1

PMO n.º	Secuencia de nucleótidos	Valor calculado	Valor medido
1	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTC	8520,95	8520,65
2	GTTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCCT	8542,94	8542,57
3	GCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	8505,95	8506,57
4	CCGCTGCCCAATGTCCTGGAGTTCCT	8520,95	8521,37
5	TTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	8511,94	8511,70
6	TTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTCCT	8526,94	8527,07
7	TTTGCCGCTGCCTCCTGGAGTTCC	7857,71	7857,32
8	TGCCGCTGCCCCGCCATCCTGGAGTTC	8521,95	8521,98
9	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	7897,72	7897,71
10	CAGTTTGCCGCTGCCCACATCCTGGAGTTCCT	9851,40	9851,60
11	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCCT	8551,95	8551,80
12	GTTTGCCGCTGCCATCCTGGAGTTC	8236,84	8236,69
13	CAGTTTGCCGCTGCTGGAGTTCCT	7921,73	7921,91
14	ACAGTTTGCCGCTCTGGAGTTCCT	7905,73	7905,53
15	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCT	7906,73	7906,65
16	GTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	7567,61	7567,35
17	CAGTTTGCCGCTGCCGGAGTTCCTG	8261,85	8261,67
18	CCGCTGCCCAATGTGGAGTTCCTGT	8245,85	8245,68
19	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTC	7906,73	7906,70
20	CCGCTGCCCAATCTGGAGTTCCT	7520,61	7520,60
21	CAGTTTGCCGCTGCCCTGGAGTTCC	8221,84	8221,48
22	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCT	7866,72	7866,77
23	TTGCCGCTGCCCCACTGGAGTTCCTGT	8551,95	8552,23
24	ACAGTTTGCCGCCTGGAGTTCC	7245,51	7245,48
25	GTTTGCCGCTGC	3912,36	3912,16
26	CCTGGAGTTCCT	3896,36	3896,12
27	TGGAGTTCCT	3266,14	3265,99
28	CAGTTTGCCGCTGCCC	5196,81	5196,30
29	TCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTT	8510,93	8511,8
30	AGACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTT	8513,95	8513,72
31	TTCTTCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	9826,39	9826,15
32	CAGACCTCCTGCCACGCCATCCTGGAGTTC	9814,41	9813,82
33	GACCTCCTGCCACCATCCTGGAGTTC	8489,95	8490,01

Tabla 6-2

34	TCCCCAGTTGCGCCATCCTGGAGTTC	8520,95	8520,97
35	GACCTCCTGCCGCCATCCTGGAGTTC	8505,95	8506,48
36	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	8495,94	8495,43
37	TTCCCCAGTTGCACATCCTGGAGTTC	8519,95	8520,35
38	CCTCCTGCCACCGCATCCTGGAGTTC	8465,94	8466,23
39	ACCTCCTGCCACCCATCCTGGAGTTC	8449,94	8449,88
40	TTTCTTCCCCAGTCATCCTGGAGTTC	8485,93	8486,01
41	GCAGACCTCCTGCCATCCTGGAGTTC	8529,96	8529,54
42	TTCTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTC	9156,16	9156,62
43	CCCCAGTTGCATCTGGAGTTCCT	7535,61	7535,92
44	TTCTTCCCCAGTTGCCCTGGAGTTC	8486,93	8486,27
45	CTTCCCCAGTTGCCATCCTGGAGTTCCT	9141,16	9141,18
46	CAGACCTCCTGCCACTCCTGGAGTTC	8489,95	8489,65
47	TGCAGACCTCCTGCCTCCTGGAGTTC	8520,95	8520,58
48	CTGTTTGCAGACCCATCCTGGAGTTC	8559,96	8560,66
49	TTTGCAGACCTCCTGGAGTTCCTGTA	8574,96	8574,85
50	CCTGCCACCGCAGATGCCATCCTGGAGTTC	9854,42	9854,07
51	ACCTCCTGCCACCGCTTGCCGCTGCCCAAT	9750,39	9750,67
52	TCCTGTAGAATACCATCCTGGAGTTC	8567,97	8567,11
53	CTCCTGCCACCGCTGGCATCTGTTTT	8486,93	8486,39
54	ACCTCCTGCCACCGCTCTTCCCCAGTTGCA	9725,38	9725,57
55	TGGCATCTGTTTTCATCCTGGAGTTC	8580,95	8580,81
56	TTATTTCTTCCCCAGTTCCTGTAAGA	8508,94	8508,7
57	GCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8504,95	8504,88
58	GGCTTCCCAATGCCATCCTGGAGTTC	8544,96	8544,72
59	TTTCTGTCTGACAGCTCCTGCCACCGCAGA	9844,41	9844,1
60	TCCTGCCACCGCAGAGAGGATTGCTGAATT	9957,45	9957,8
61	TCCTGCCACCGCAGACTGGCATCTGTTTTT	9850,4	9850,45
62	TCCTGCCACCGCAGATTTTCTGTAGAATA	9867,42	9867,85
63	GCCATCCTGGAGTTC	4905,71	4905,02
64	TTCTTCCCCAGTTGC	4831,68	4831,14
65	CAGACCTCCTGCCAC	4819,7	4819,64
66	TCCTGGAGTTCCT	4226,47	4226,03
67	GTTTGCCGCTGCC	4227,47	4227,48
68	CTCCTGCCACCGCGCCGCTGCCCAAT	8435,93	8436,58

Tabla 6-3

69	ATTCAGGCTTCCCTTCCCCAGTTGCA	8479,93	8479,03
70	TGGAGTTCC	2936,03	2936,07
71	TGGAGTTC	2620,92	2620,97
72	CAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6906,39	6906,44
73	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCCCT	7260,51	7260,67
74	GTTTGCCGCTGCCTGGAGTTCC	7252,5	7252,48
75	AACAGTTTGCCCTGGAGTTCC	7229,51	7229,07
76	CAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6591,28	6591,07
77	CAGTTTGCCGCTCCTGGAGTTCC	7236,5	7236,76
78	AGTTTGCCGCTCCTGGAGTTCC	6921,39	6921,06
79	ACAGTTTGCCGCTGGAGTTCC	6930,4	6930,42
80	TGCCGCTGCCCATCCTGGAGTTCC	7851,72	7852,1
81	CTGCCACCGCAGCCGCTGCCCAATGC	8484,96	8484,68
82	CCTGGAGTTCC	3566,25	3566,51
83	CAGTTTGCCG	3251,14	3251,19
84	ACAGTTTGCCG	3590,26	3590,04

Ejemplo de ensayo 1

Ensayo *in vitro*

- 5 En 3,5 x 10⁵ células RD (línea de células de rabdomiosarcoma humano), los oligómeros antisentido mostrados en la tabla 1 se transfectaron cada uno de 1 a 10 µM mediante Nucleofector II (Lonza) usando un kit Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L. El programa usado fue T-030.

Después de la transfección, las células se cultivaron durante tres noches a 37 °C bajo condiciones de CO₂ al 5% en 2 ml de medio esencial mínimo de Eagle ("Eagle's minimal essential medium", EMEM) (SIGMA; lo mismo se aplica en lo sucesivo) que contenía suero bovino fetal ("fetal bovine serum", FBS) al 10% (Invitrogen).

- 10 Después de lavar las células una vez con PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japón; lo mismo se aplica en lo sucesivo), se añadieron 350 µl de tampón RLT (QIAGEN) que contenía 2-mercaptoetanol al 1% (Nacalai Tesque, Inc., Japón) a las células, y las células se lisaron dejándolas en reposo a temperatura ambiente durante unos pocos minutos. El lisado de células se introdujo en un homogeneizador QIAshredder (QIAGEN) y se centrifugó a 15.000 rpm durante 2 minutos para preparar un homogeneizado. El ARN total se extrajo según el protocolo incluido en un minikit RNeasy (QIAGEN). Se midió la concentración del ARN total extraído con un espectrofotómetro NanoDrop
- 15 ND-1000 (LMS Co., Ltd., Japón).

- 20 Se realizó una RT-PCR en una sola etapa con 400 ng del ARN total extraído usando un kit QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN). Se preparó una disolución de reacción según el protocolo incluido en el kit. El termociclador utilizado fue PTC-100 (MJ Research) o TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc., Japón). El programa de RT-PCR usado se muestra a continuación.

50 °C durante 30 minutos: reacción de transcripción inversa

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

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

- 25 72 °C durante 10 minutos: reacción de alargamiento final

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores directo e inverso usados para la RT-PCR se muestran a continuación.

Cebador directo: 5'-GCTCAGGTCCGATTGACATT-3' (SEQ ID NO:1)

Cebador inverso: 5'-GGGCAACTCTTCCACAGTA-3' (SEQ ID NO:2)

- 30 El anterior producto de la reacción de PCR (1 µl) se analizó usando un Bioanalyzer (Agilent) y un sistema MultiNA (Shimadzu Corporation, Japón).

Se midió el nivel del polinucleótido "A" en la banda con la omisión del exón 45 y el nivel del polinucleótido "B" en la banda sin omisión del exón 45. Basándose en estos valores medidos de "A" y "B", se determinó la eficacia de la omisión según la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 1 a 5, 8, 10, 11 y 16 a 24. Este experimento indica que el oligómero de la presente invención provoca la omisión del exón 45 de modo eficaz.

5 Ejemplo de ensayo 2

Ensayo *in vitro*

Se repitieron los mismos procedimientos mostrados en el ejemplo de ensayo 1 para realizar este experimento, excepto que se transfectaron $3,5 \times 10^5$ células RD (línea de células de rhabdomyosarcoma humano) con el oligómero de la presente invención por sí solo (PMO n.º 11 o PMO n.º 9) o con cualquiera de las dos unidades de oligómeros que constituyen el oligómero de la presente invención o con una de sus mezclas a una concentración de 3 µM mediante Nucleofector II (Lonza) usando un kit Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L. El programa usado fue T-030. A continuación, se muestran combinaciones de las secuencias transfectadas.

Tabla 7 - Combinaciones de las secuencias transfectadas

Combinación de secuencias	Concentración de transfección (µM)
PMO n.º 11 (PMO n.º 27 y PMO n.º 28 conectados entre sí)	3 µM
PMO n.º 27	3 µM
PMO n.º 28	3 µM
PMO n.º 27 y PMO n.º 28	3 µM cada uno
PMO n.º 9 (PMO n.º 25 y PMO n.º 26 conectados entre sí)	3 µM
PMO n.º 25	3 µM
PMO n.º 26	3 µM
PMO n.º 25 y PMO n.º 26	3 µM cada uno
PMO n.º 72 (PMO n.º 82 y PMO n.º 83 conectados entre sí)	3 µM
PMO n.º 82	3 µM
PMO n.º 83	3 µM
PMO n.º 82 y PMO n.º 83	3 µM cada uno

15 Resultados experimentales

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 6 y 25. Este experimento indica que los oligómeros de la presente invención, es decir, PMO n.º 11 (SEQ ID NO:10), PMO n.º 9 (SEQ ID NO:8) o PMO n.º 72 (SEQ ID NO:79), que consisten cada uno en dos oligómeros antisentido conectados que se dirigen a diferentes sitios en el exón 45, provocan la omisión del exón 45 con mayor eficacia cuando se compara con los respectivos oligómeros antisentido que constituyen cada oligómero (es decir, PMO n.º 27 (SEQ ID NO:36), PMO n.º 28 (SEQ ID NO:37), PMO n.º 25 (SEQ ID NO:34), PMO n.º 26 (SEQ ID NO:35), PMO n.º 82 (SEQ ID NO:144) o PMO n.º 83 (SEQ ID NO:145)) o una de sus mezclas (es decir, PMO n.º 27 y PMO n.º 28, PMO n.º 25 y PMO n.º 26, o PMO n.º 82 y PMO n.º 83).

Ejemplo de ensayo 3

Ensayo *in vitro*

25 Este experimento se realizó usando los oligómeros antisentido en forma de 2'-O-metoxi-fosforotioato (2'-OMe-S-ARN) mostrados en SEQ ID NO:89 a 141, 11 y 12. Estos diversos oligómeros antisentido usados para el ensayo se adquirieron en Japan Bio Services Co., Ltd. Las secuencias de estos diversos oligómeros antisentido se muestran a continuación.

Tabla 8-1

Nombre de la secuencia	Secuencia de nucleótidos	SEQ ID NO:
H45_1-15_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCGCCAUCCUGGAGUUC	89
H45_1-15_56-70	UUUUUUCUUCCCCAGGCCAUCCUGGAGUUC	90
H45_1-15_131-145	CCUCCUGCCACCGCAGCCAUCCUGGAGUUC	91
H45_-2-13_131-145	CCUCCUGCCACCGCACAUCCUGGAGUCCU	92
H45_-2-13_135-149	CAGACCUCCUGCCACCAUCCUGGAGUCCU	93
H45_-2-13_48-62	UCCCCAGUUGCAUUCGAUCCUGGAGUCCU	94
H45_-2-13_52-66	UUCUUCCCCAGUUGCCAUCCUGGAGUCCU	95
H45_-2-13_56-70	UUUUUUCUUCCCCAGCAUCCUGGAGUCCU	96

H45_-2-13_18-32	GUUUGCCGCUGCCCACAUCCUGGAGUCCU	97
H45_-2-13_139-153	UUUGCAGACCUCUGCAUCCUGGAGUCCU	98
H45_1-17_135-147	GACCUCCUGCCACAUGCCAUCCUGGAGUUC	99
H45_1-17_52-64	CUUCCCCAGUUGCAUGCCAUCCUGGAGUUC	100
H45_1-15_139-153	UUUGCAGACCUCUGGCCAUCCUGGAGUUC	101
H45_-2-13_99-113	UUUUCUGUAGAAUACAUCCUGGAGUCCU	102
H45_53-67_132-146	ACCUCCUGCCACCGCUUUCUCCCCAGUUG	103
H45_16-30_99-113	UUUUCUGUAGAAUAUUGCCGCUGCCCAAU	104
H45_1-15_153-167	CUGUCUGACAGCUGUGCCAUCCUGGAGUUC	105
H45_1-15_67-81	GGAUUGCUGAAUUAUGCCAUCCUGGAGUUC	106
H45_1-15_99-113	UUUUCUGUAGAAUAGCCAUCCUGGAGUUC	107
H45_1-13_46-58	CAGUUGCAUUAACAUCCUGGAGUUC	108
H45_1-13_54-66	UUCUUCCCCAGUUCAUCCUGGAGUUC	109
H45_1-13_62-74	UGAAUUAUUUCUUAUCCUGGAGUUC	110
H45_6-18_46-58	CAGUUGCAUUAUAAUGCCAUCCUGG	111
H45_6-18_54-66	UUCUUCCCCAGUUAUUGCCAUCCUGG	112
H45_6-18_62-74	UGAAUUAUUUCUUAUUGCCAUCCUGG	113
H45_1-13_121-133	GCAGAUUCAGGCUCAUCCUGGAGUUC	114
H45_1-13_129-141	CUGCCACCGCAGACAUCCUGGAGUUC	115
H45_1-13_137-149	CAGACCUCCUGCCCAUCCUGGAGUUC	116
H45_6-18_121-133	GCAGAUUCAGGCUAUUGCCAUCCUGG	117
H45_6-18_129-141	CUGCCACCGCAGAAUUGCCAUCCUGG	118
H45_6-18_137-149	CAGACCUCCUGCCAAUUGCCAUCCUGG	142
H45_16-28_116-128	UUCAGGCUUCCCAGCCGCUGCCCAAU	119
H45_16-28_124-136	ACCGCAGAUUCAGGCCGCUGCCCAAU	120

Tabla 8-2

H45_16-28_132-144	CUCCUGCCACCGCGCCGCGUCCCCAAU	121
H45_26-38_116-128	UUCAGGCUUCCCAACAACAGUUUGCC	122
H45_26-38_124-136	ACCGCAGAUUCAGACAACAGUUUGCC	123
H45_26-38_132-144	CUCCUGCCACCGCACAACAGUUUGCC	124
H45_51-63_110-122	CUUCCCAAUUUUUUUCUCCAGUUGCA	125
H45_51-63_117-129	AUUCAGGCUUCCCUUCCUCCAGUUGCA	126
H45_51-63_124-136	ACCGCAGAUUCAGUUCUCCUCCAGUUGCA	127
H45_60-72_110-122	CUUCCCAAUUUUUUAAUUAUUUCUCC	128
H45_60-72_117-129	AUUCAGGCUUCCCAAUUAUUUCUCC	129
H45_60-72_124-136	ACCGCAGAUUCAGAAUUAUUUCUCC	130
H45_68-80_110-122	CUUCCCAAUUUUUGAUUGCUGAAUUA	131
H45_68-80_117-129	AUUCAGGCUUCCCGAUUGCUGAAUUA	132
H45_68-80_124-136	ACCGCAGAUUCAGGAUUGCUGAAUUA	133
H45_-10-5_52-66	UUCUUCUCCUCCAGUUGCAGUUCUGUAAGUA	134
H45_-10-5_135-149	CAGACCUCCUGCCACAGUUCUCCUGUAAGUA	135
H45_69-83_95-109	CCUGUAGAAUACUGGGAGGAUUGCUGAAUUA	136
H45_16-30_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUUUGCCGCGUCCCCAAU	137
H45_16-30_53-67	UUUCUUCUCCUCCAGUUGUUGCCGCGUCCCCAAU	138
H45_1-15_84-98	CUGGCAUCUGUUUUUGCCAUCUCCUGGAGUUC	139
H45_84-98_132-146	ACCUCCUGCCACCGCCUGGCAUCUGUUUUUU	140
H45_53-67_99-113	UUUUCUCCUGUAGAAUUAUUUCUCCUCCUCCAGUUG	141
H45_1-15_52-66	UUCUUCUCCUCCAGUUGCUGCCAUCUCCUGGAGUUC	11
H45_1-15_135-149	CAGACCUCCUGCCACGCCAUCUCCUGGAGUUC	12

Se sembraron en placas de 24 pocillos 5 x 10⁴ células RD (línea de células de rabdomiosarcoma humano) por pocillo y se cultivaron durante la noche a 37 °C bajo condiciones de CO₂ al 5% en 0,5 ml de medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) (SIGMA; lo mismo se aplica en lo sucesivo) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10% (Invitrogen). Los anteriores diversos oligómeros antisentido para la omisión del exón 45 (Japan Bio Services Co., Ltd., Japón) (1 µM o 300 nM) se formaron en conjugados con Lipofectamine 2000 (Invitrogen), y cada conjugado se añadió a las células RD, que se colocaron en 0,45 ml de medio fresco, en un volumen de 50 µl por pocillo, para obtener una concentración final de 100 nM o 30 nM.

Después de la adición, las células se cultivaron durante la noche. Después de lavar las células una vez con PBS (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Japón; lo mismo se aplica en lo sucesivo), se añadieron 350 µl de tampón RLT (QIAGEN) que contenía 2-mercaptoetanol al 1% (Nacalai Tesque, Inc., Japón) a las células, y las células se lisaron dejándolas en reposo a temperatura ambiente durante unos pocos minutos. El lisado de células se introdujo en un homogeneizador QIAshredder (QIAGEN) y se centrifugó a 15.000 rpm durante 2 minutos para preparar un homogeneizado. El ARN total se extrajo según el protocolo incluido en un minikit RNeasy (QIAGEN). Se midió la concentración del ARN total extraído con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (LMS Co., Ltd., Japón).

Se realizó una RT-PCR en una sola etapa con 400 ng del ARN total extraído usando un kit QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (QIAGEN). Se preparó una disolución de reacción según el protocolo incluido en el kit. El termociclador utilizado fue PTC-100 (MJ Research) o TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch (Takara Bio Inc., Japón). El programa de RT-PCR usado se muestra a continuación.

50 °C durante 30 minutos: reacción de transcripción inversa

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

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

72 °C durante 10 minutos: reacción de alargamiento final

Las secuencias de nucleótidos de los cebadores directo e inverso usados para la RT-PCR se muestran a continuación.

Cebador directo: 5'-GCTCAGGTCGGATTGACATT-3' (SEQ ID NO:1)

Cebador inverso: 5'-GGGCAACTCTTCCACCAGTA-3' (SEQ ID NO:2)

El anterior producto de la reacción de PCR (1 µl) se analizó usando un Bioanalyzer (Agilent) y un sistema MultiNA (Shimadzu Corporation, Japón).

Se midió el nivel del polinucleótido "A" en la banda con la omisión del exón 45 y el nivel del polinucleótido "B" en la banda sin omisión del exón 45. Basándose en estos valores medidos de "A" y "B", se determinó la eficacia de la omisión según la siguiente ecuación:

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

Resultados experimentales

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 7 y 12 a 15. Este experimento indica que el oligómero de la presente invención provoca la omisión del exón 45 de modo eficaz.

Ejemplo de ensayo 4

Ensayo *in vitro*

Se repitieron los mismos procedimientos mostrados en el ejemplo de ensayo 1 para realizar este experimento, excepto que se transfectaron $3,5 \times 10^5$ células RD (línea de células de rabdomiosarcoma humano) con el oligómero de la presente invención por sí solo (PMO n.º 2, PMO n.º 31 o PMO n.º 32) o con cualquiera de las dos unidades de oligómeros que constituyen el oligómero de la presente invención o con una de sus mezclas a una concentración de 3 µM o 10 µM mediante Nucleofector II (Lonza) usando un kit Amaxa Cell Line Nucleofector Kit L. El programa usado fue T-030. A continuación, se muestran las combinaciones de las secuencias transfectadas.

Tabla 9

Secuencia	Concentración de transfección
PMO n.º 2 (PMO n.º 66 y PMO n.º 67 conectados entre sí)	3 µM o 10 µM
PMO n.º 66	3 µM o 10 µM
PMO n.º 67	3 µM o 10 µM
PMO n.º 31 (PMO n.º 63 y PMO n.º 64 conectados entre sí)	3 µM o 10 µM
PMO n.º 63	3 µM o 10 µM
PMO n.º 64	3 µM o 10 µM
PMO n.º 32 (PMO n.º 63 y PMO n.º 65 conectados entre sí)	3 µM o 10 µM
PMO n.º 65	3 µM o 10 µM

Resultados experimentales

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9. Este experimento indica que los oligómeros de la presente invención, es decir, PMO n.º 2 (SEQ ID NO:7), PMO n.º 31 (SEQ ID NO:11) y PMO n.º 32 (SEQ ID NO:12), que consisten cada uno en dos oligómeros antisentido conectados que se dirigen a diferentes sitios en el exón 45, provocan la omisión del exón 45 con mayor eficacia cuando se compara con los respectivos ácidos nucleicos antisentido que constituyen cada oligómero (es decir, PMO n.º 66, PMO n.º 63, PMO n.º 64 o PMO n.º 65).

Aplicabilidad industrial

Como puede observarse a partir de los resultados experimentales mostrados en los ejemplos de ensayo, se ha demostrado que el oligómero de la presente invención que consiste en oligómeros cortos conectados entre sí provoca la omisión del exón 45 en células RD. Por tanto, el oligómero de la presente invención es muy útil en el tratamiento de la DMD.

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> Ácido nucleico antisentido

5 <130> G1428WO

<150> JP2015-182145

<151> 2015-09-15

10 <160> 146

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 1

25 gctcaggtcg gattgacatt 20

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 2

35 gggcaactct tccaccagta 20

<210> 3

<211> 20

<212> ADN

40 <213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

45 <400> 3

tacaggaact ccaggatggc 20

<210> 4

<211> 23

50 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético

55 <400> 4

gaatgcaact gggaagaaa taa 23

<210> 5

60 <211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Ácido nucleico sintético
 <400> 5
 atctgcggtg gcaggaggtc tgc 23
 5
 <210> 6
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 6
 cattgggcag cggcaaactg ttgtca 26
 15
 <210> 7
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 7
 gttgccgct gcctcctgga gttcct 26
 25
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 8
 gttgccgct gccctggagt tcct 24
 35
 <210> 9
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 9
 cagtttgccg ctgcccatcc tggagttcct 30
 45
 <210> 10
 <211> 26
 <212> **ADN**
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 <400> 10
 cagtttgccg ctgccctgga gttcct 26
 60
 <210> 11
 <211> 30
 <212> **ADN**
 <213> Artificial
 65
 <220>

<223> Ácido nucleico sintético

<400> 11
 5 ttctcccca gttgcgcat cctggagttc 30

<210> 12
 <211> 30
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 12
 15 cagacctct gccacgcat cctggagttc 30

<210> 13
 <211> 176
 <212> **ADN**
 20 <213> Homo sapiens

<400> 13
 gaactccagg atggcattgg gcagcggcaa actgttgtca gaacattgaa tgcaactggg 60

gaagaaataa ttcagcaatc ctcaaaaaca gatgccagta ttctacagga aaaattggga 120

agcctgaatc tgcggtggca ggaggtctgc aaacagctgt cagacagaaa aaagag 176

25 <210> 14
 <211> 26
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 14
 35 ttgccgtgc ccacatctg gagttc 26

<210> 15
 <211> 26
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

<400> 15
 45 gccgctgcc acatcctgga gttcct 26

<210> 16
 <211> 26
 <212> **ADN**
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

55 <400> 16
 ccgctgcca atgtcctgga gttcct 26

<210> 17
 <211> 26
 <212> **ADN**
 60 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 17
 ttgccgctgc ccatcctgga gttcct 26

10 <210> 18
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 18
 ttgccgctg ccatcctgga gttcct 26

20 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 19
 ttgccgctg cctcctggag ttcc 24

30 <210> 20
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 20
 tgccgctgcc cgccatcctg gagttc 26

40 <210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 21
 gtttgccgct gccatcctgg agttc 25

50 <210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 22
 cagtttgccg ctgctggagt tcct 24

65 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 23
 acagttgcc gctctggagt tcct 24

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

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 24
 cagtttgccg ctgccggagt tcct 24

20 <210> 25
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 25
 gtttgccgct gccctggagt tcc 23

30 <210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 26
 cagtttgccg ctgccggagt tcctg 25

40 <210> 27
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 27
 ccgctgcccc atgtggagtt cctgt 25

50 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 28
 cagtttgccg ctgccctgga gttc 24

65 <210> 29
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 29
 ccgctgcccc atctggagtt cct 23

10 <210> 30
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 30
 cagtttgccg ctgccctgga gttcc 25

20 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 31
 ttgccgctgc ccaactggagt tcct 24

30 <210> 32
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 32
 ttgccgctgc ccaactggagt tcctgt 26

40 <210> 33
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 33
 acagtttgcc gcctggagtt cc 22

50 <210> 34
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 34
 gtttgccgct gc 12

65 <210> 35
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 35
 cctggagttc ct 12

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

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 36
 tggagttcct 10

20 <210> 37
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 37
 cagtttgccg ctgccc 16

30 <210> 38
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 38
 tcttccccag ttgccatcct ggagtt 26

40 <210> 39
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 39
 agacctcctg ccaccatcct ggagtt 26

55 <210> 40
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 40
 gacctcctgc caccatcctg gagttc 26

65 <210> 41
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 41
 5 tccccagttg cgccatcctg gagttc 26

 <210> 42
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 42
 15 gacctcctgc cgccatcctg gagttc 26

 <210> 43
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 25
 <400> 43
 ctccccagt tgccatcctg gagttc 26

 <210> 44
 30 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 44
 ttccccagtt gcacatcctg gagttc 26

 <210> 45
 40 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 45
 50 cctcctgcc cgcacatcctg gagttc 26

 <210> 46
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 46
 60 acctcctgcc acccatcctg gagttc 26

 <210> 47
 <211> 26
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 47
 ttcttcccc agtcacctcg gagttc 26

10 <210> 48
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 48
 gcagacctcc tgccatcctg gagttc 26

20 <210> 49
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 49
 ttctcccca gttgccatcc tggagttc 28

30 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 50
 cccagttgc atctggagtt cct 23

40 <210> 51
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 51
 ttctcccca gttgccctgg agttcc 26

50 <210> 52
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 52
 ctccccagt tgccatcctg gagttcct 28

65 <210> 53
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 53
 cagacctcct gccactcctg gagttc 26

10 <210> 54
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 54
 tgcagacctc ctgcctcctg gagttc 26

20 <210> 55
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 55
 ctgtttgcag acccatcctg gagttc 26

30 <210> 56
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 56
 ttgcagacc tcctggagtt cctgta 26

40 <210> 57
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 57
 cctgccaccg cagatgccat cctggagttc 30

55 <210> 58
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 58
 acctcctgcc accgcttgcc gctgccaat 30

65 <210> 59
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 59
 5 tcctgtagaa taccatcctg gagttc 26

 <210> 60
 <211> 26
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 60
 15 ctctgccac cgctggcatc tgtttt 26

 <210> 61
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 25
 <400> 61
 acctcctgcc accgctcttc cccagttgca 30

 <210> 62
 30 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 62
 tggcatctgt ttcatcctg gagttc 26

 <210> 63
 40 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 45 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 63
 50 ttatttcttc cccagttcct gtaaga 26

 <210> 64
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 64
 60 gcttccaat gccatcctgg agttcc 26

 <210> 65
 <211> 26
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 65
 ggcttcccaa tgccatcctg gagttc 26

10 <210> 66
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 66
 ttctgtctg acagctcctg ccaccgcaga 30

20 <210> 67
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 67
 tcctgccacc gcagagagga ttgctgaatt 30

30 <210> 68
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 68
 tcctgccacc gcagactggc atctgtttt 30

40 <210> 69
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 69
 tcctgccacc gcagatttct ctgtagaata 30

55 <210> 70
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 70
 gccatcctgg agttc 15

65 <210> 71
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 71
 ttcttcccca gttgc 15

10 <210> 72
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

15 <400> 72
 cagacctct gccac 15

20 <210> 73
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

25 <400> 73
 tcctggagtt cct 13

30 <210> 74
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 74
 gtttgccgct gcc 13

40 <210> 75
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 75
 ctctgccac cgcgccgctg cccaat 26

50 <210> 76
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

60 <400> 76
 attcaggctt cccttcccca gttgca 26

65 <210> 77
 <211> 9
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 77
 5 tggagttcc 9

 <210> 78
 <211> 8
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 15 <400> 78
 tggagttc 8

 <210> 79
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 25
 <400> 79
 cagtttgccg cctggagttc c 21

 <210> 80
 30 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 80
 acagtttgcc gctggagttc ct 22

 40 <210> 81
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 81
 50 gtttgccgct gcctggagtt cc 22

 <210> 82
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 82
 60 aacagtttgc ccctggagtt cc 22

 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Artificial

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

5 <400> 83
 cagtttgccg cctggagttc 20

10 <210> 84
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

20 <400> 84
 cagtttgccg ctctggagt tc 22

25 <210> 85
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

35 <400> 85
 agtttgccgc tctggagtt c 21

40 <210> 86
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

50 <400> 86
 acagtttgcc gctggagttc c 21

55 <210> 87
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

65 <400> 87
 tgccgctgcc catcctggag ttcc 24

70 <210> 88
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial

75 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

80 <400> 88
 ctgccaccgc agccgctgcc caatgc 26

85 <210> 89
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 89 uccccaguug cauucgccau ccuggaguuc	30	
	<210> 90		
	<211> 30		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 90 uuauuucuuc cccaggccau ccuggaguuc	30	
	<210> 91		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 91 ccuccugcca cgcagccau ccuggaguuc	30	
	<210> 92		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 92 ccuccugcca cgcacaucc uggaguuccu	30	
40	<210> 93		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 93 cagaccuccu gccaccaucc uggaguuccu	30	
50	<210> 94		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 94 uccccaguug cauuccaucc uggaguuccu	30	
60	<210> 95		
	<211> 30		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 95 uucuucccca guugccaucc uggaguuccu	30	
	<210> 96		
	<211> 30		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 96 uuauuucuuc cccagcaucc uggaguuccu	30	
	<210> 97		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 97 guuugccgc gccacaucc uggaguuccu	30	
	<210> 98		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 98 uuugcagacc uccugcaucc uggaguuccu	30	
40	<210> 99		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 99 gaccuccugc cacaugccau ccuggaguuc	30	
50	<210> 100		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 100 cuuccccagu ugcaugccau ccuggaguuc	30	
60	<210> 101		
	<211> 30		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 101 uuugcagacc uccuggccau ccuggaguuc	30	
	<210> 102		
	<211> 30		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 102 uuuuccugua gaauacaucc uggaguuccu	30	
	<210> 103		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 103 accuccugcc accgcuuucu ucccaguug	30	
	<210> 104		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 104 uuuuccugua gaauauugcc gcugcccaau	30	
40	<210> 105		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 105 cugucugaca gcugugccau ccuggaguuc	30	
50	<210> 106		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 106 ggauugcuga auuauugccau ccuggaguuc	30	
60	<210> 107		
	<211> 30		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 107		
5	uuuuccugua gaauagccau ccuggaguuc	30	
	<210> 108		
	<211> 26		
	<212> ADN		
10	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 108		
15	caguugcauu caacauccug gaguuc	26	
	<210> 109		
	<211> 26		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 109		
	uucuucccca guucauccug gaguuc	26	
	<210> 110		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 110		
	ugaauuauuu cuucauccug gaguuc	26	
40	<210> 111		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 111		
50	caguugcauu caaaaugcca uccugg	26	
	<210> 112		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 112		
60	uucuucccca guuaaugcca uccugg	26	
	<210> 113		
	<211> 26		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 113 ugaauuauuu cuuaaugcca uccugg	26	
	<210> 114		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 114 gcagauucag gcucauccug gaguuc	26	
	<210> 115		
	<211> 26		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 115 cugccaccgc agacauccug gaguuc	26	
	<210> 116		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 116 cagaccuccu gcccauccug gaguuc	26	
40	<210> 117		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 117 gcagauucag gcuaaugcca uccugg	26	
50	<210> 118		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 118 cugccaccgc agaaugcca uccugg	26	
60	<210> 119		
	<211> 26		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 119 uucaggcuuc ccagccgcug cccaau	26	
	<210> 120		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 120 accgcagauu caggccgcug cccaau	26	
	<210> 121		
	<211> 26		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 121 cuccugccac cgcgccgcug cccaau	26	
	<210> 122		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 122 uucaggcuuc ccaacaacag uuugcc	26	
40	<210> 123		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 123 accgcagauu cagacaacag uuugcc	26	
50	<210> 124		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 124 cuccugccac cgcacaacag uuugcc	26	
60	<210> 125		
	<211> 26		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 125 cuucccaauu uuuuucccca guugca	26	
	<210> 126		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 126 auucagguu cccuucccca guugca	26	
	<210> 127		
	<211> 26		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 127 accgcagauu caguucccca guugca	26	
	<210> 128		
30	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 128 cuucccaauu uuuuauuuu ucuucc	26	
40	<210> 129		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 129 auucagguu cccaauuuu ucuucc	26	
50	<210> 130		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 130 accgcagauu cagaauuuu ucuucc	26	
60	<210> 131		
	<211> 26		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 131 cuucccaauu uuugauugcu gaauua	26	
	<210> 132		
	<211> 26		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 132 auucagguu cccgauugcu gaauua	26	
	<210> 133		
	<211> 26		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 133 accgcagauu caggauugcu gaauua	26	
	<210> 134		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 134 uucuucccca guugcaguuc cuguaagaua	30	
40	<210> 135		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 135 cagaccuccu gccacaguuc cuguaagaua	30	
50	<210> 136		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 136 ccuguagaau acugggagga uugcugaauu	30	
60	<210> 137		
	<211> 30		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
5	<400> 137 cuggcaucug uuuuuuugcc gcugcccaau	30	
	<210> 138		
	<211> 30		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
15	<400> 138 uuucuucccc aguuguugcc gcugcccaau	30	
	<210> 139		
	<211> 30		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
25	<400> 139 cuggcaucug uuuuugccau ccuggaguuc	30	
	<210> 140		
30	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 140 accuccugcc accgccuggc aucuguuuuu	30	
40	<210> 141		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 141 uuuuccugua gaauuuuuc ucccaguug	30	
50	<210> 142		
	<211> 26		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Ácido nucleico sintético		
	<400> 142 cagaccuccu gccaaugcca uccugg	26	
60	<210> 143		
	<211> 16		
	<212> ADN		
65	<213> Artificial		

<220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 <400> 143
 5 aaaaattggg aagcct 16

 <210> 144
 <211> 11
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético

 15 <400> 144
 cctggagttc c 11

 <210> 145
 <211> 10
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Ácido nucleico sintético
 25
 <400> 145
 cagtttgccg 10

 <210> 146
 30 <211> 11
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 35 <223> Ácido nucleico sintético

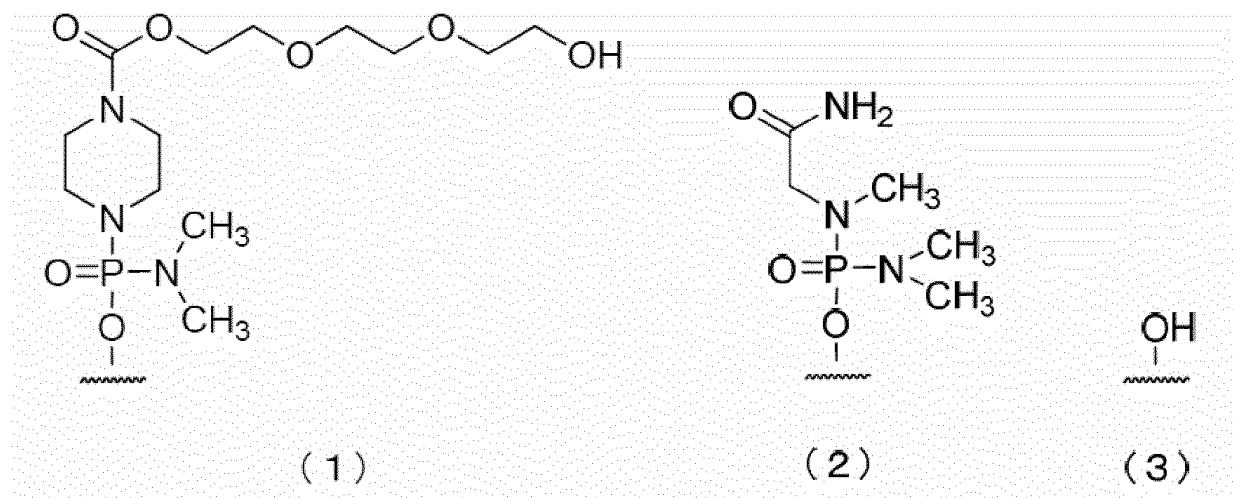
 <400> 146
 acagtttgcc g 11
 40

REIVINDICACIONES

- 1.- Un oligómero antisentido de 14 a 32 bases de longitud, que comprende dos unidades de oligómeros conectadas seleccionadas del grupo que consiste en (a) a (e) que aparecen a continuación, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, en el que las dos unidades de oligómeros no son contiguas entre sí ni se solapan entre sí:
- (a) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones -5 a 15 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;
- (b) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 48 a 70 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;
- (c) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 128 a 150 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano;
- (d) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 15 a 40 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano; y
- (e) una unidad de oligómero que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria con una secuencia de nucleótidos que consiste en 7 a 16 bases contiguas seleccionadas de una secuencia de nucleótidos localizada en las posiciones 110 a 125 desde el extremo 5'-terminal del exón 45 en el gen de distrofina humano.
- 2.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según la reivindicación 1, en el que una de las dos unidades de oligómeros es (a).
- 3.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según la reivindicación 1 o 2, que consiste en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:7 a 12, 14 a 33, 40 a 52, 57, 64, 65 y 79 a 86.
- 4.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consiste en una cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:8, 10, 25, 30, 33, 79 y 80.
- 5.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un oligonucleótido.
- 6.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según la reivindicación 5, en el que al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido se modifica en el resto azúcar y/o en el resto de enlace fosfato.
- 7.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según la reivindicación 5 o 6, en el que el resto azúcar de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es una ribosa en la que el grupo -OH en la posición 2' está sustituido por cualquier grupo seleccionado del grupo que consiste en OR, R, R'OR, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂, N₃, CN, F, Cl, Br y I (en las que R representa alquilo o arilo, y R' representa alquilenilo).
- 8.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según la reivindicación 6 o 7, en el que el resto de enlace fosfato de al menos un nucleótido que constituye el oligonucleótido es uno cualquiera seleccionado del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, un enlace fosforoditioato, un enlace alquilfosfonato, un enlace fosforoamidato y un enlace boranofosfato.
- 9.- El oligómero antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es un oligómero de morfolino, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos.
- 10.- El oligómero antisentido según la reivindicación 4 o 9, que es un oligómero de morfolino fosfordiamidato, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos.
- 11.- El oligómero antisentido según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 10, cuyo extremo 5'-terminal es uno cualquiera de los grupos representados por las fórmulas químicas (1) a (3) mostradas a continuación, o una de sus

sales farmacéuticamente aceptables o hidratos.

Fórmula 25



5 12.- Una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular, que comprende el oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, como ingrediente activo.

13.- La composición farmacéutica según la reivindicación 12, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 14.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular en un paciente con distrofia muscular, en el que el paciente es opcionalmente un paciente humano.

15.- El oligómero antisentido, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables o hidratos, para el uso según la reivindicación 14, en el que, en el tratamiento, un paciente con distrofia muscular posee una mutación que es la diana de la omisión del exón 45 en el gen de distrofina, en el que el paciente es opcionalmente un paciente humano.

15

Figura 1

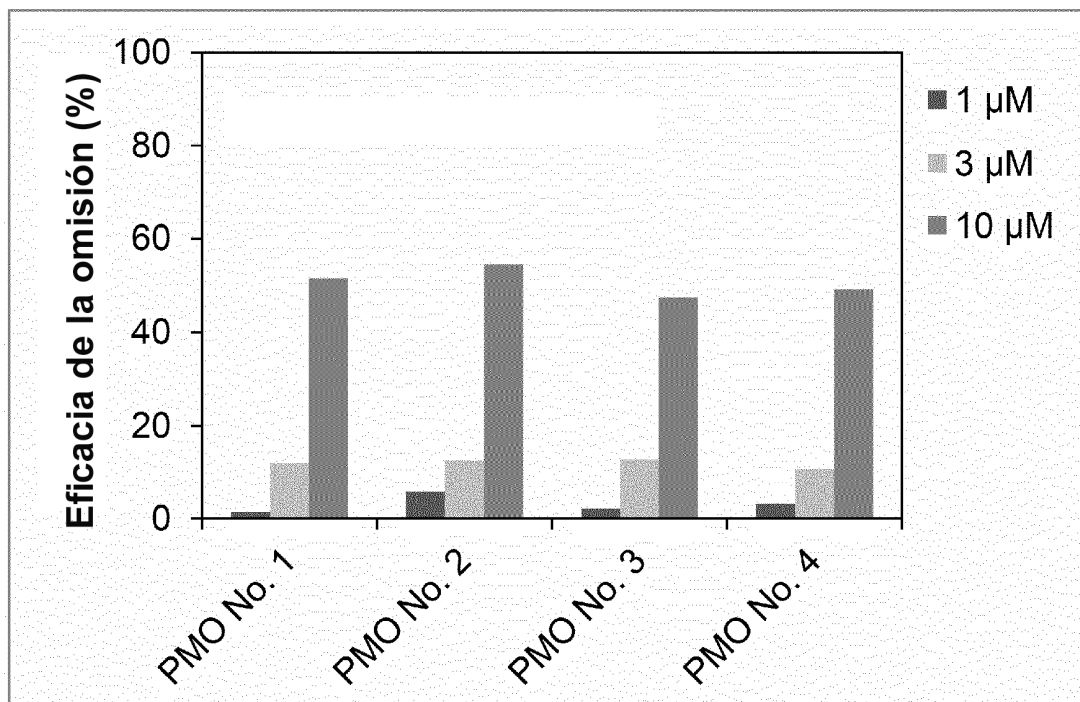


Figura 2

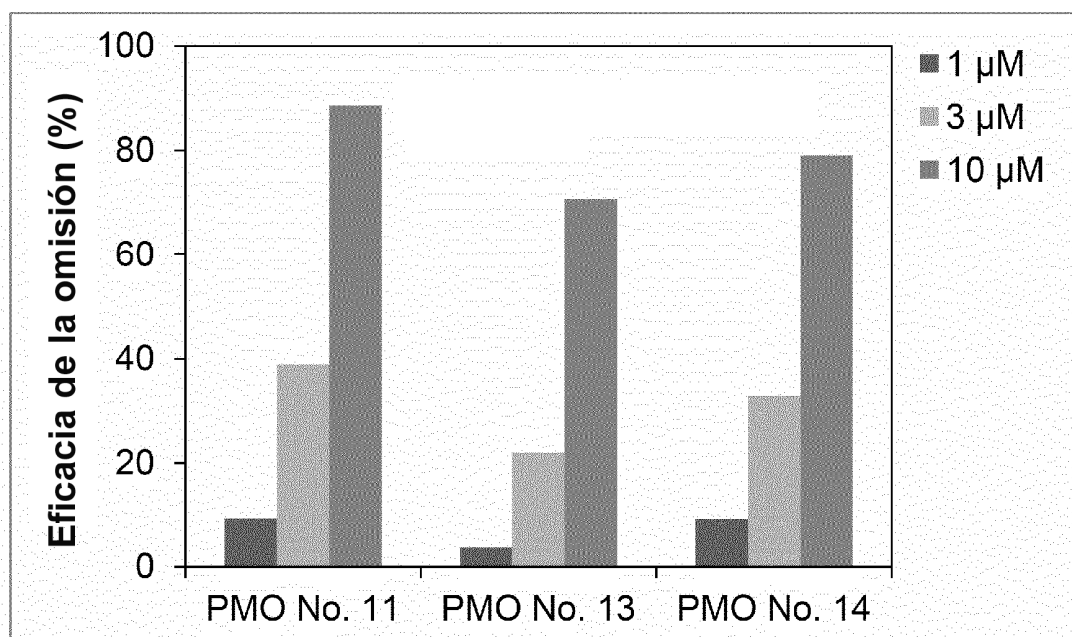


Figura 3

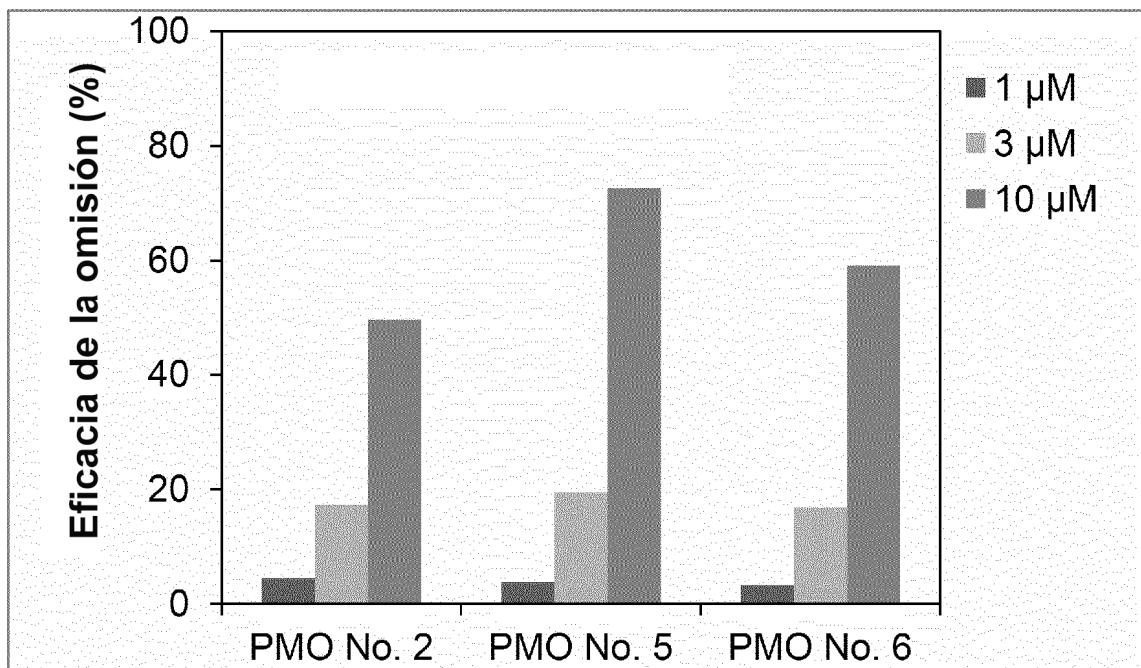


Figura 4

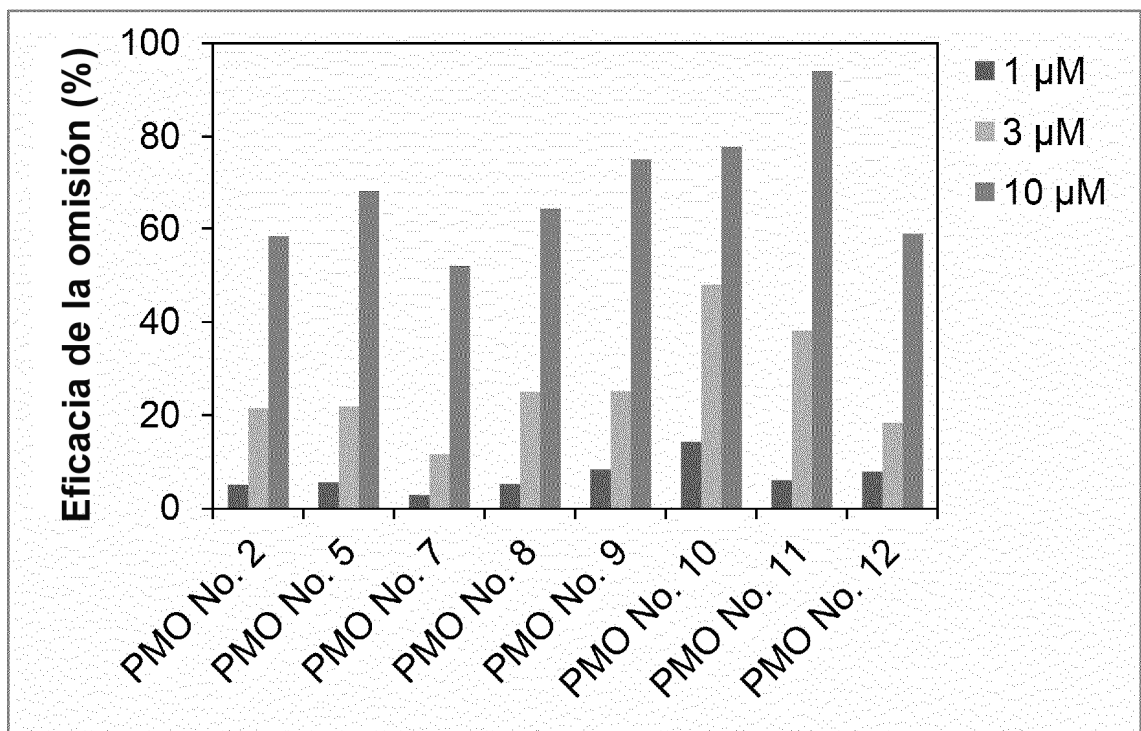


Figura 5

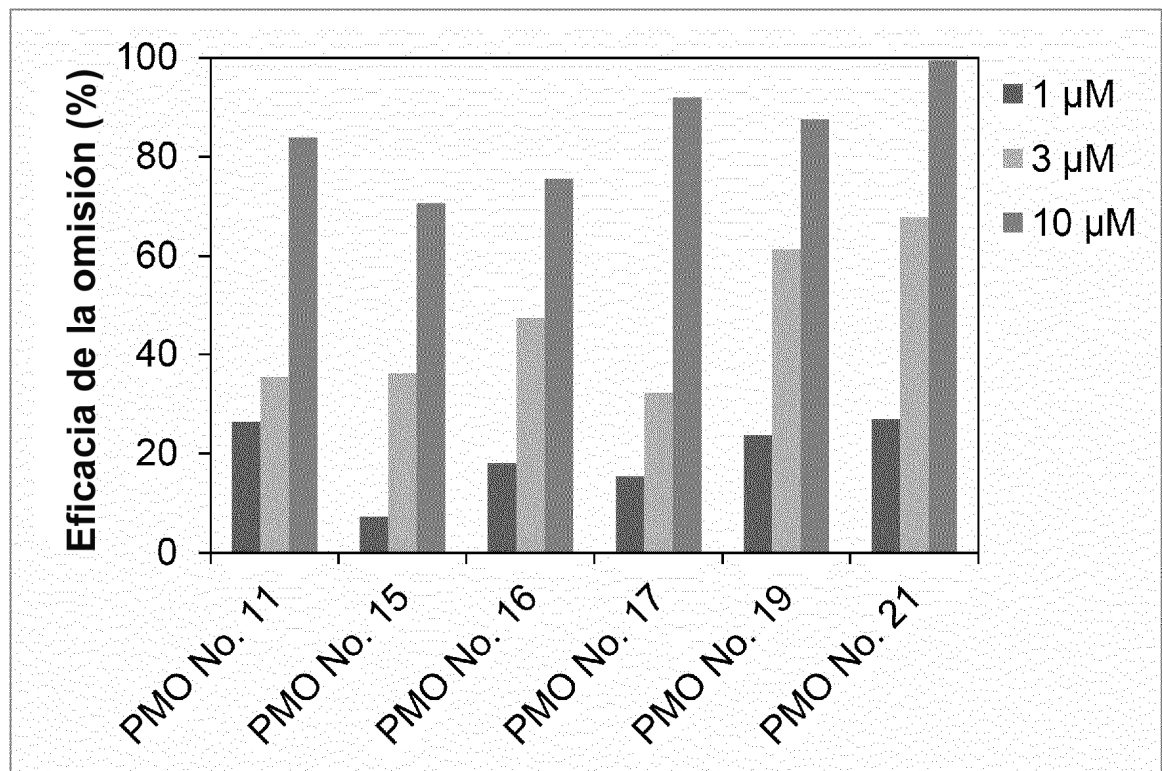


Figura 6

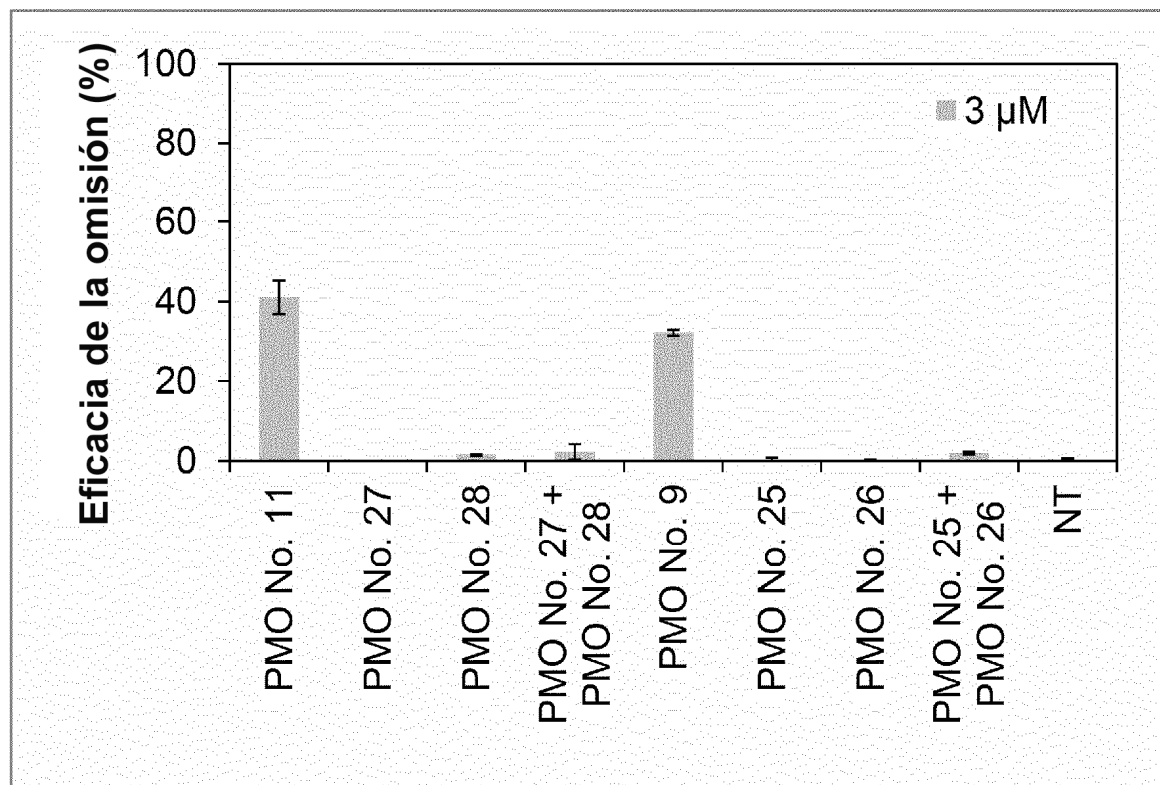


Figura 7

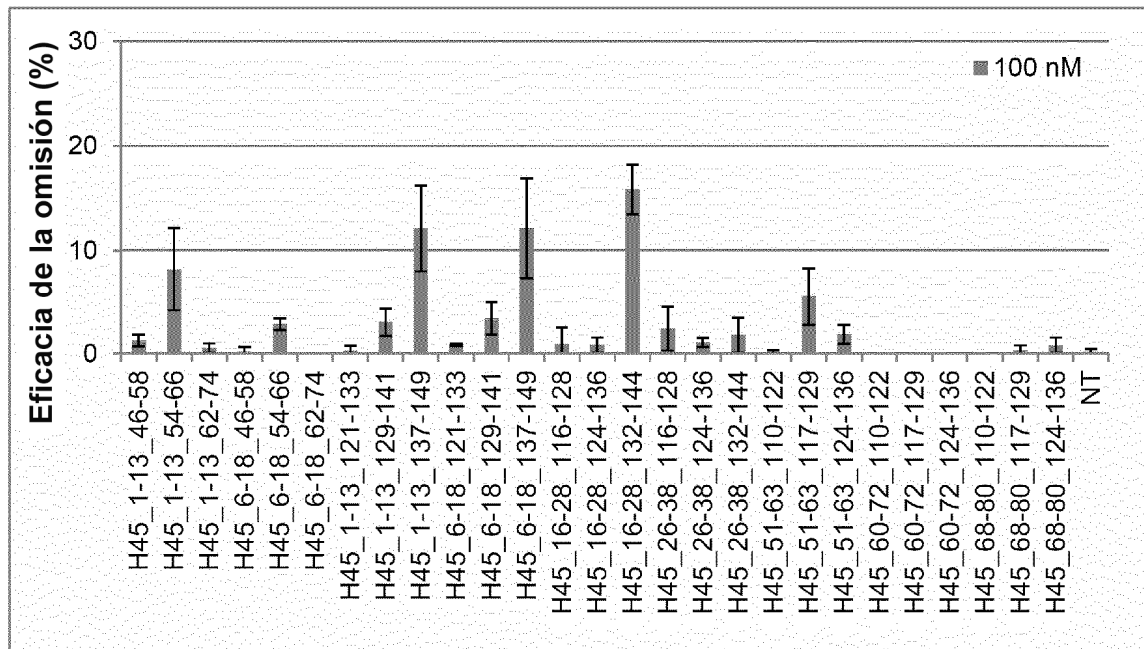


Figura 8

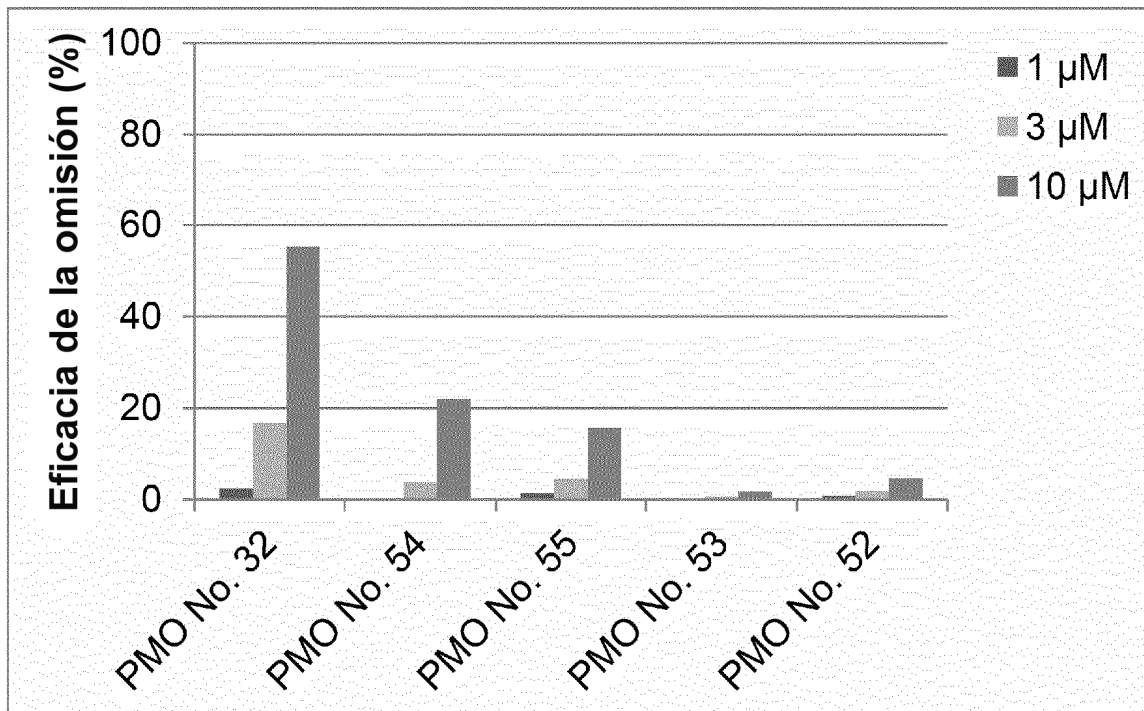


Figura 9

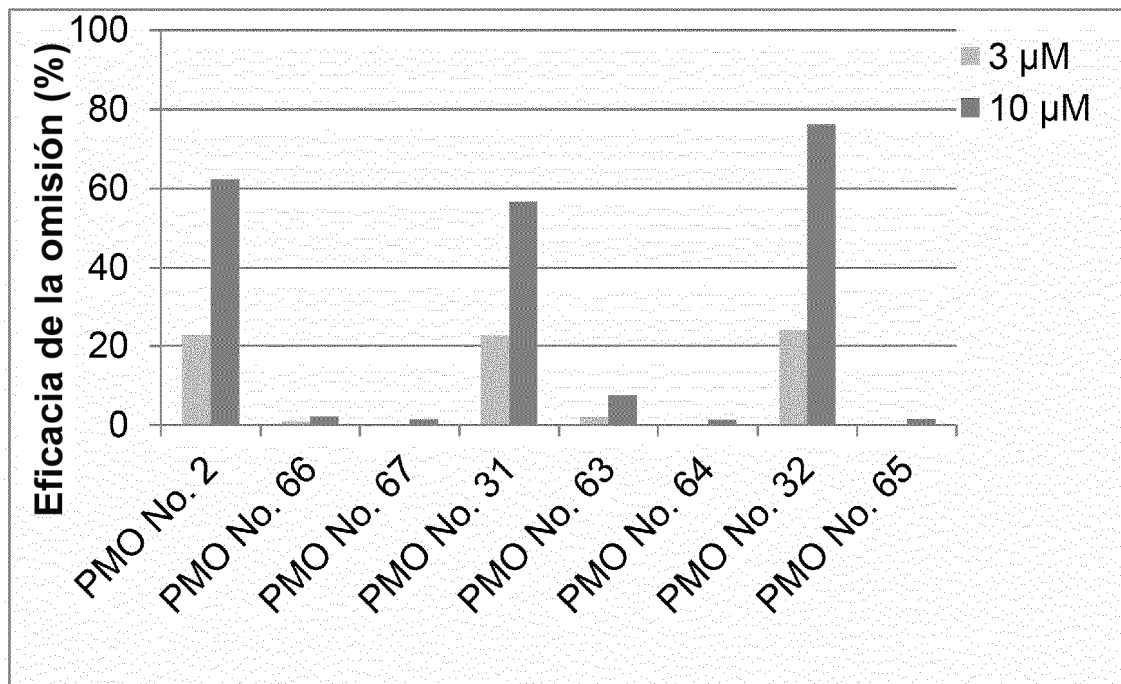


Figura 10

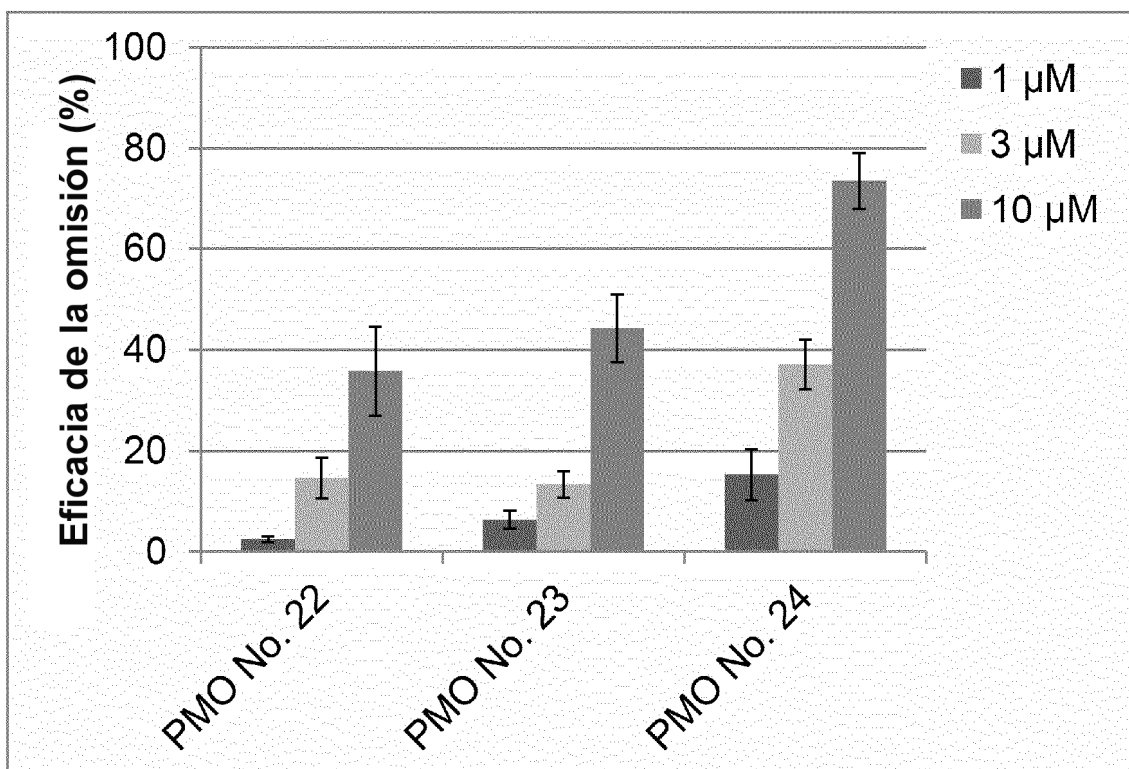


Figura 11

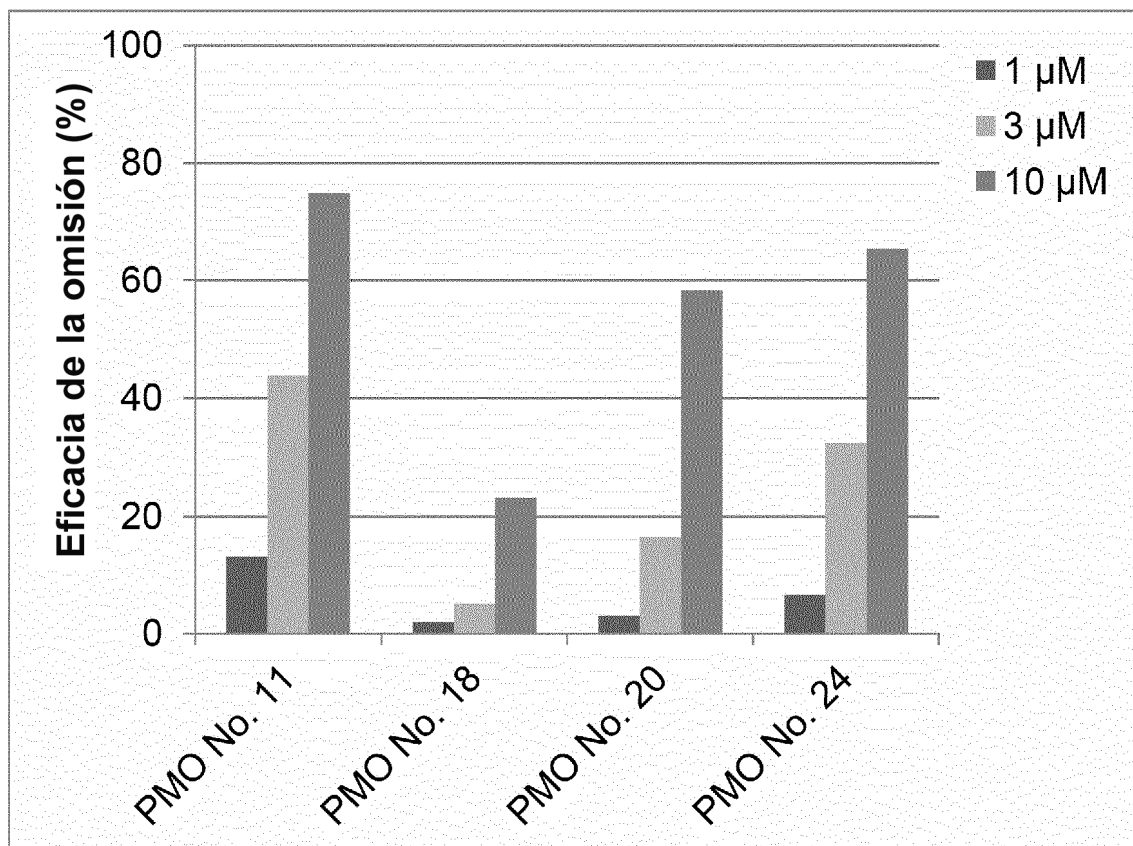


Figura 12

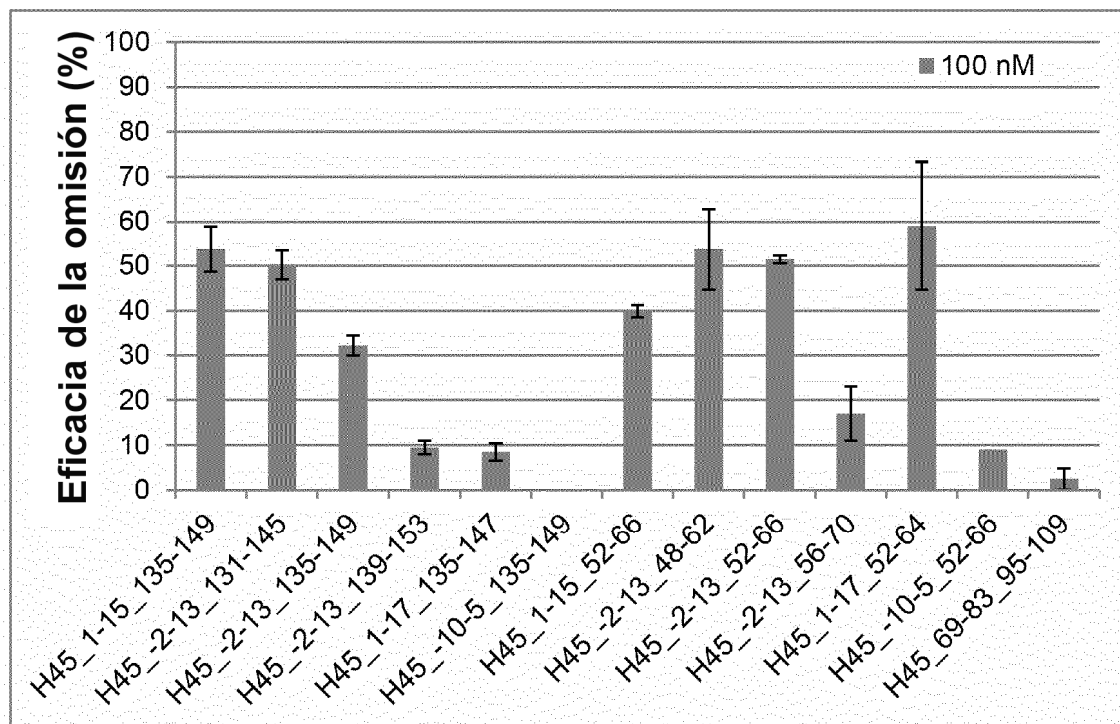


Figura 13

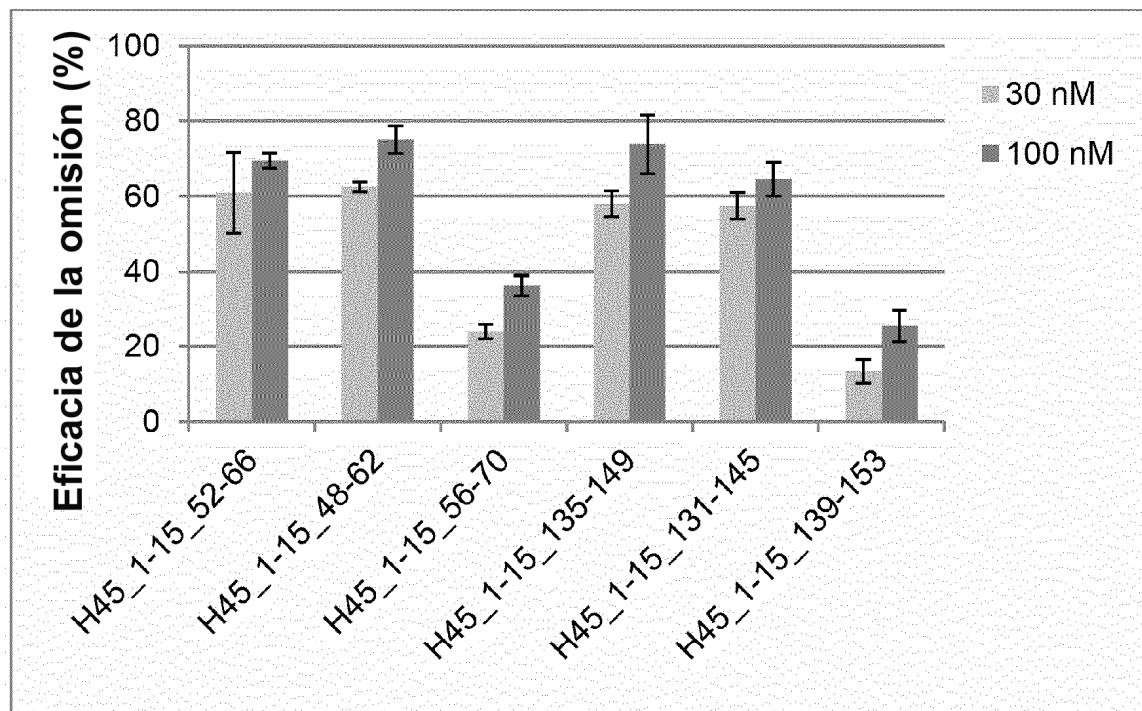


Figura 14

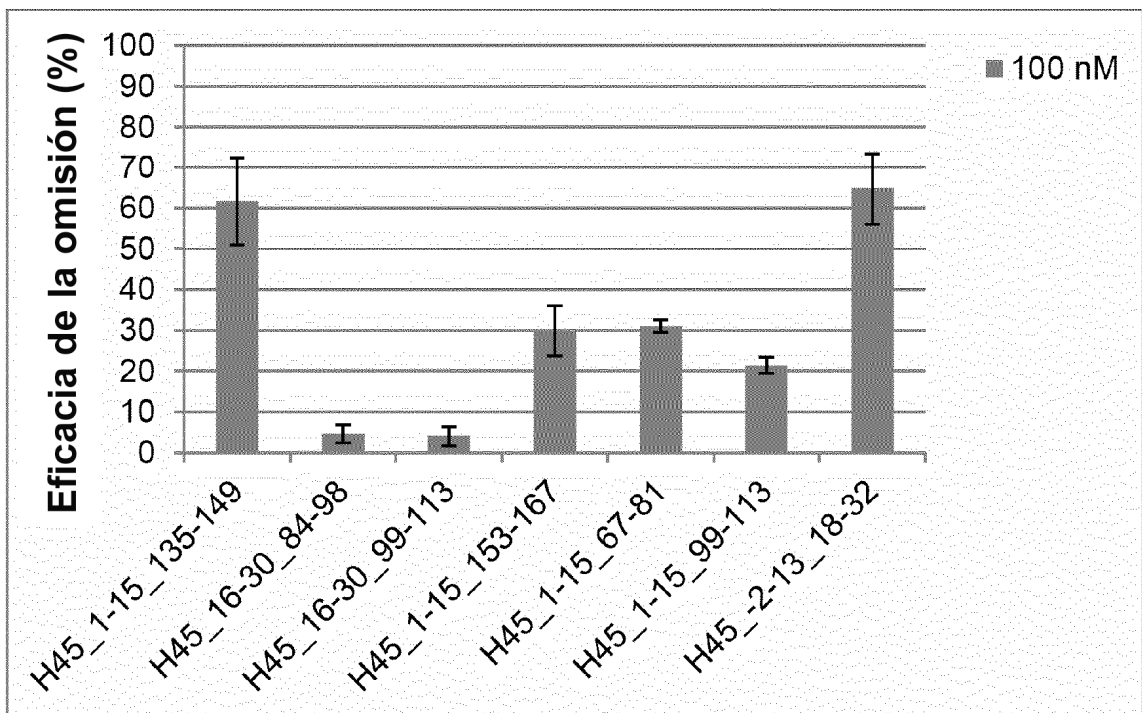


Figura 15

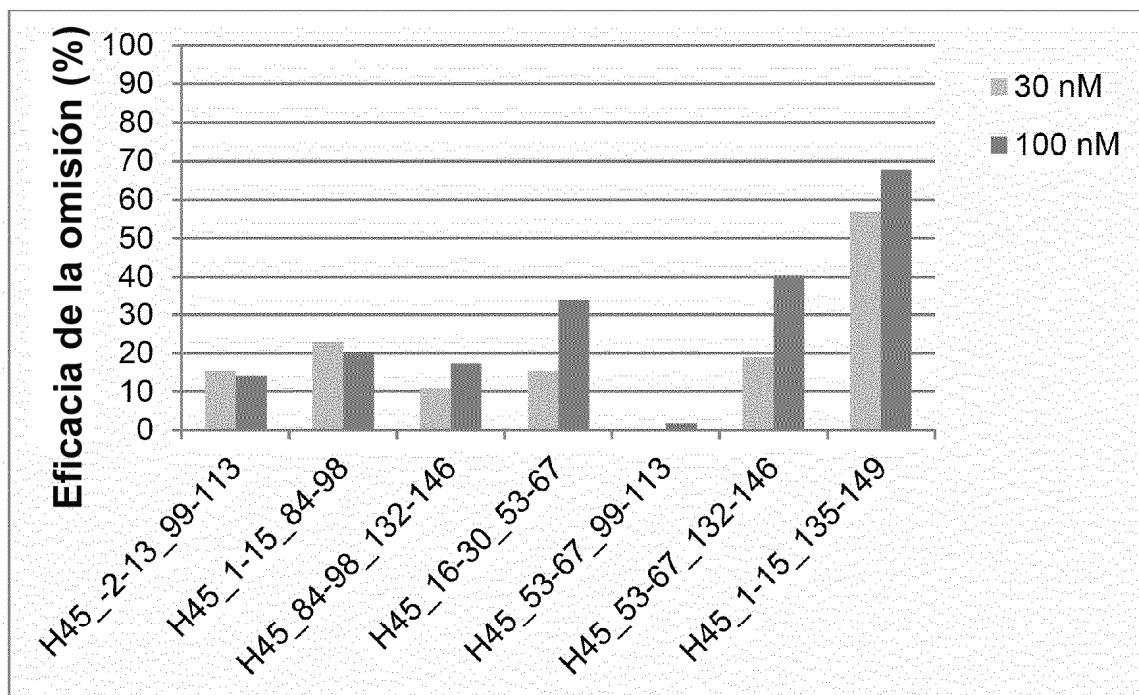


Figura 16

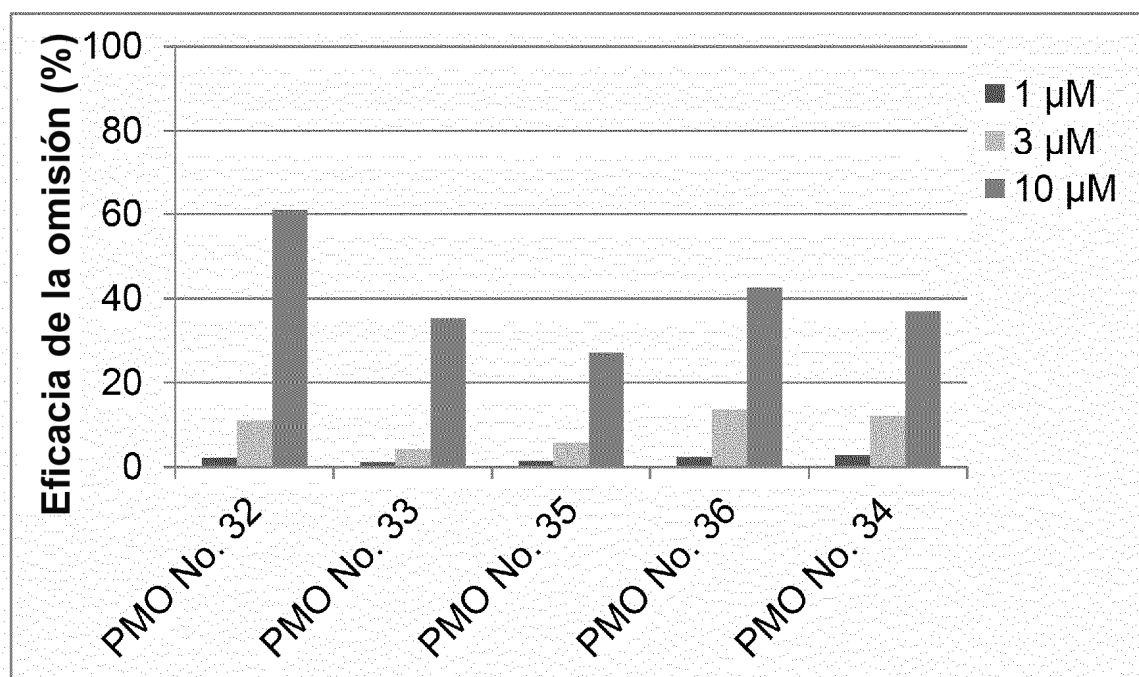


Figura 17

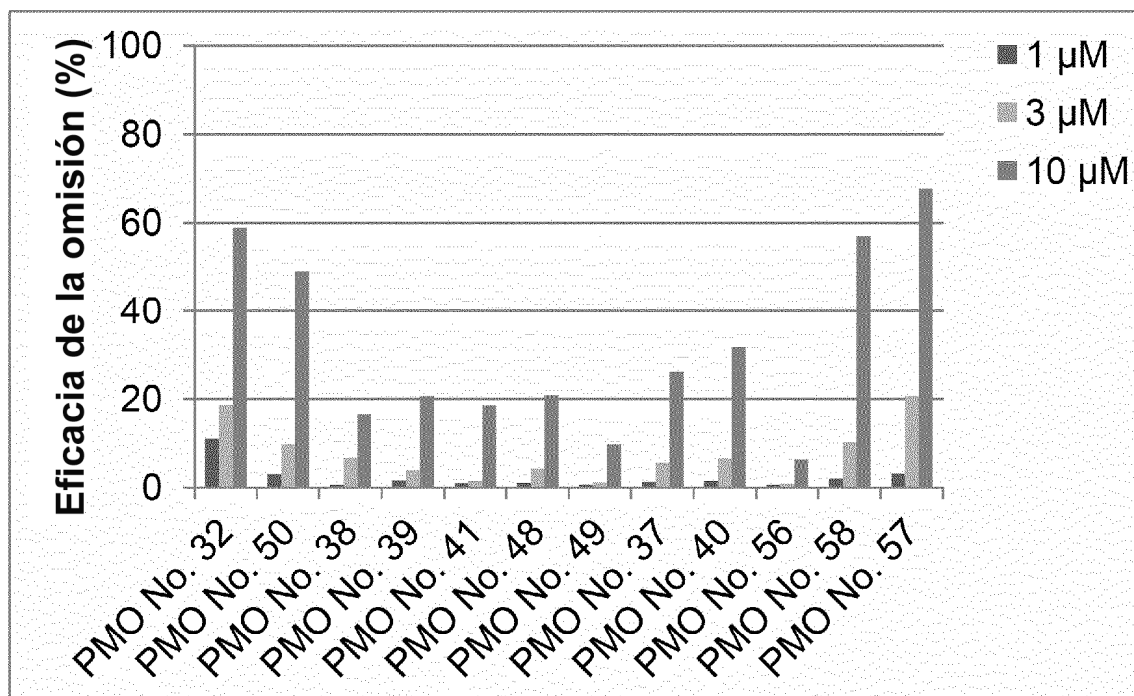


Figura 18

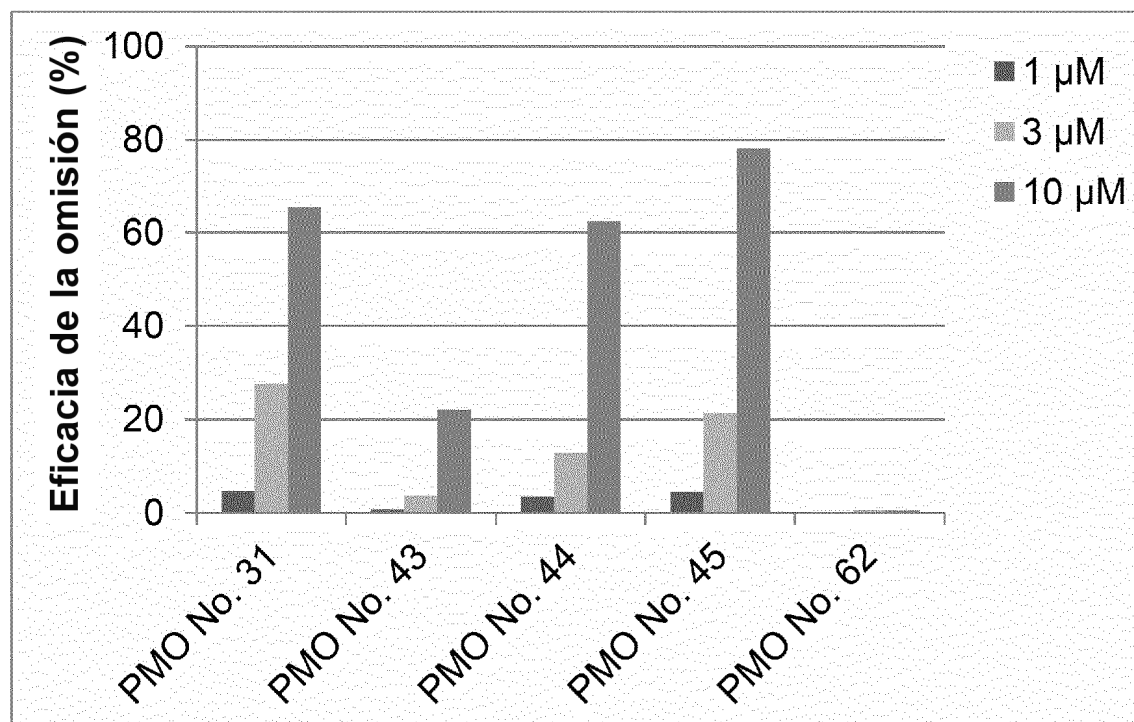


Figura 19

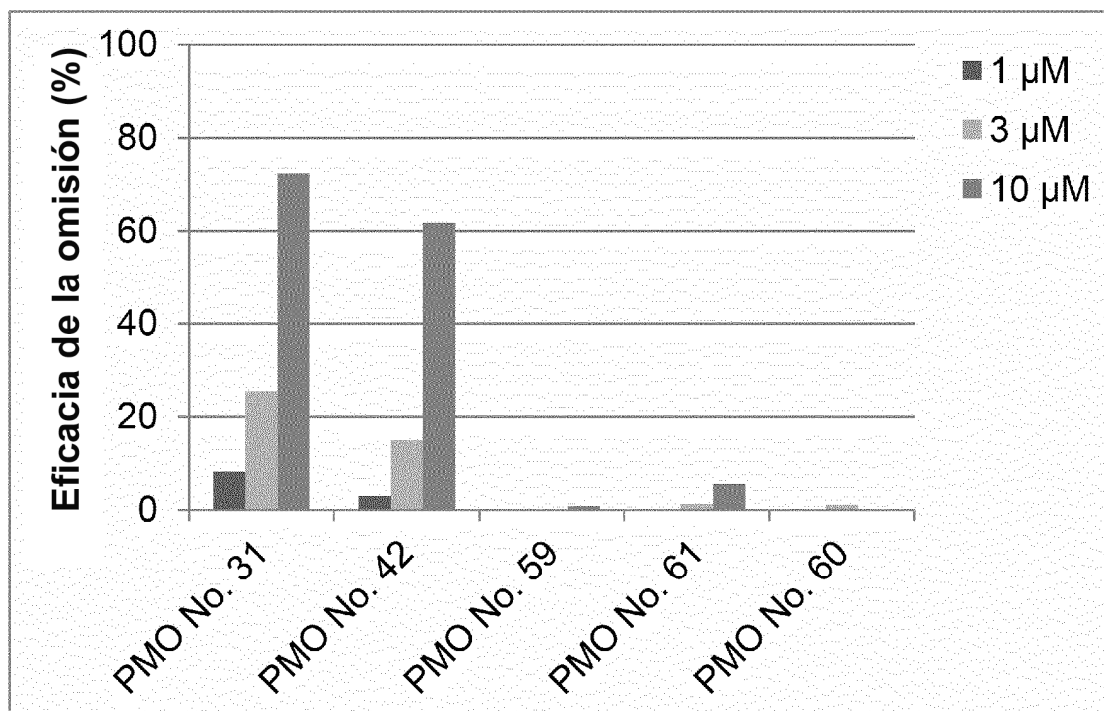


Figura 20

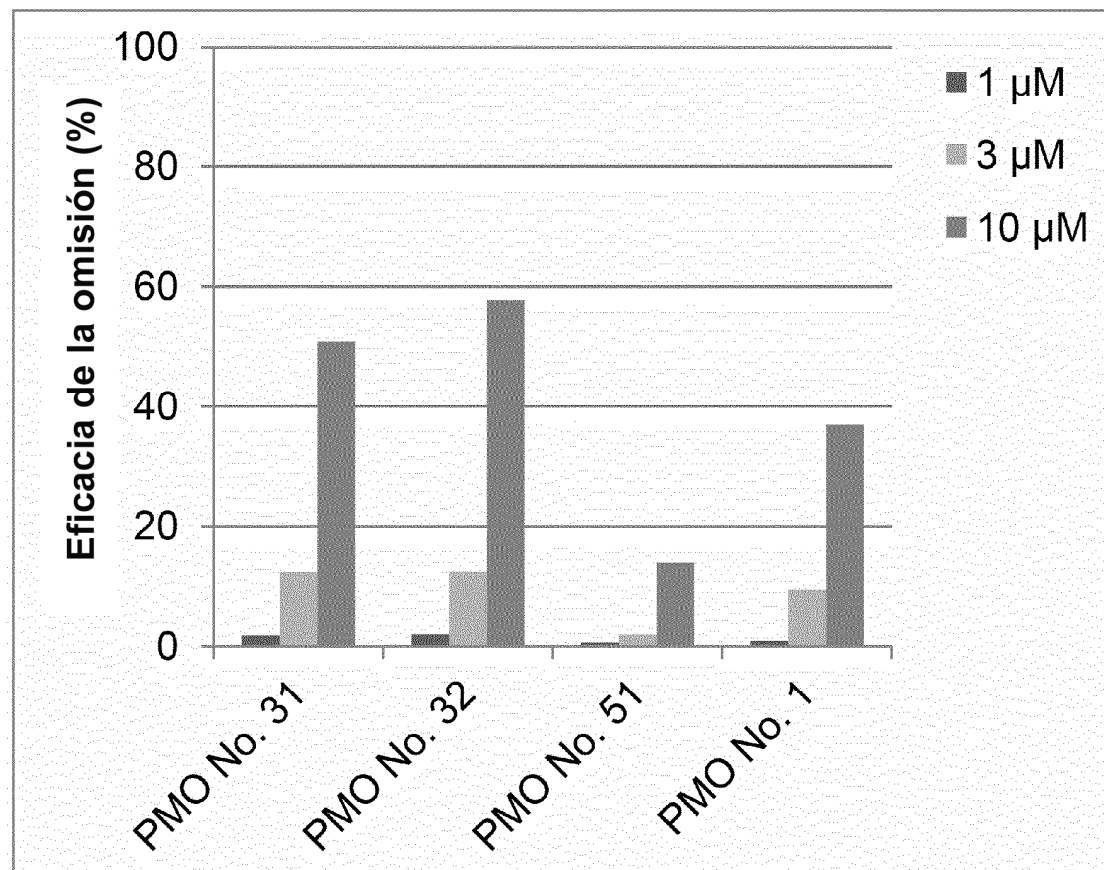


Figura 21

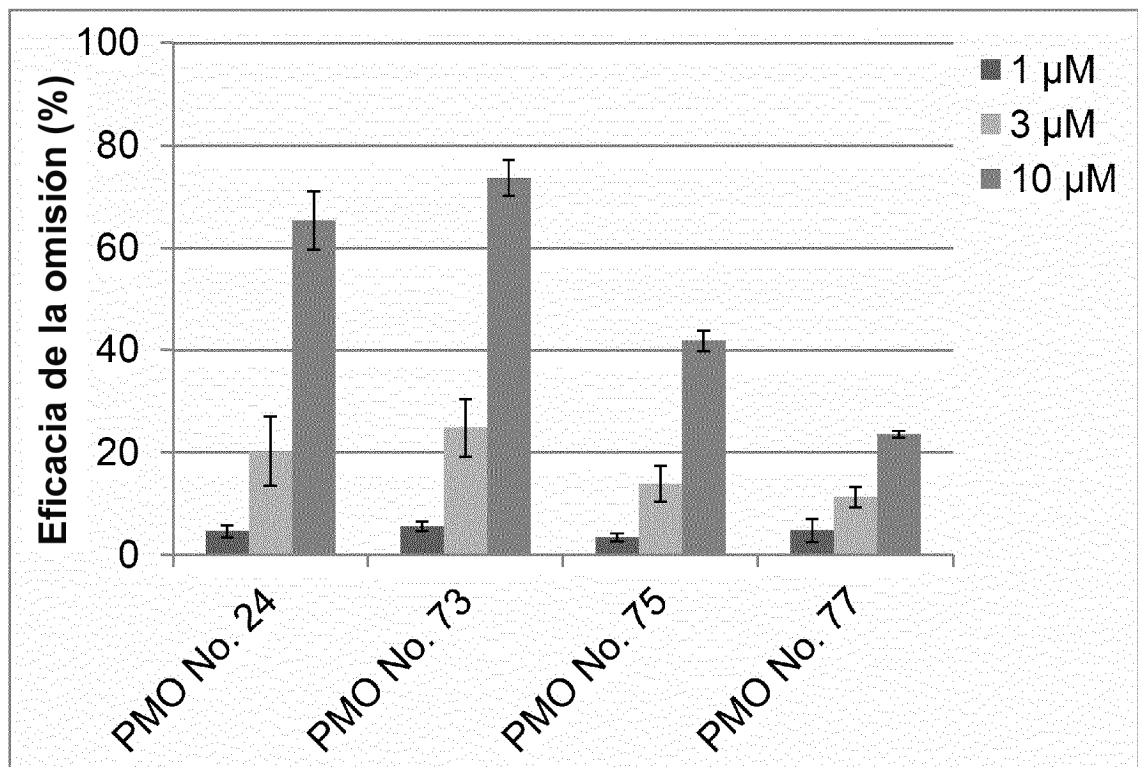


Figura 22

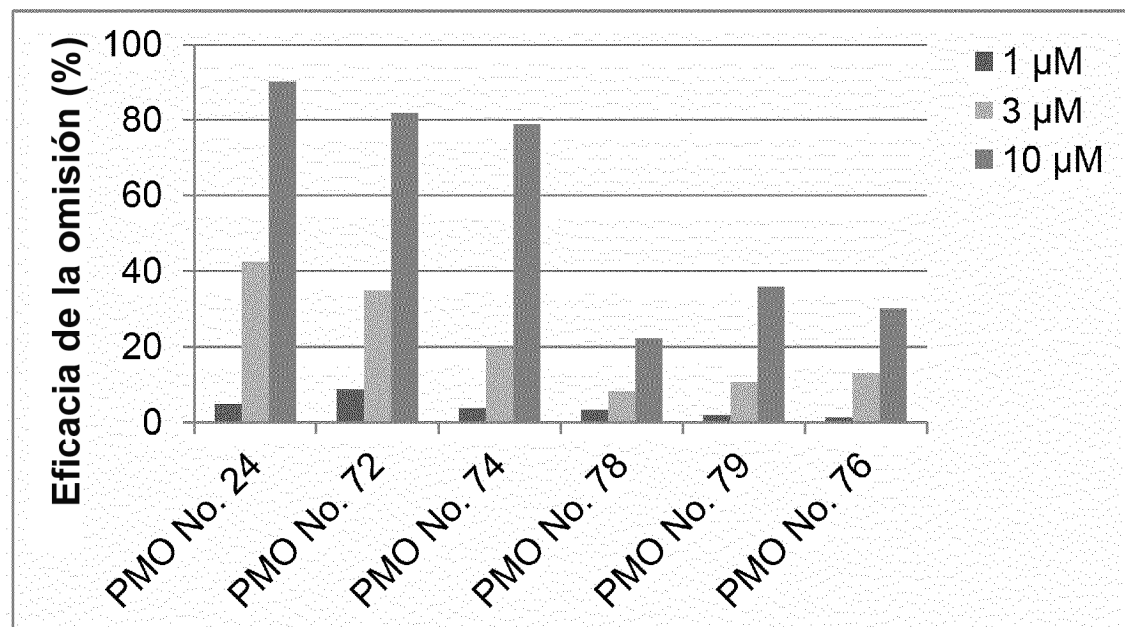


Figura 23

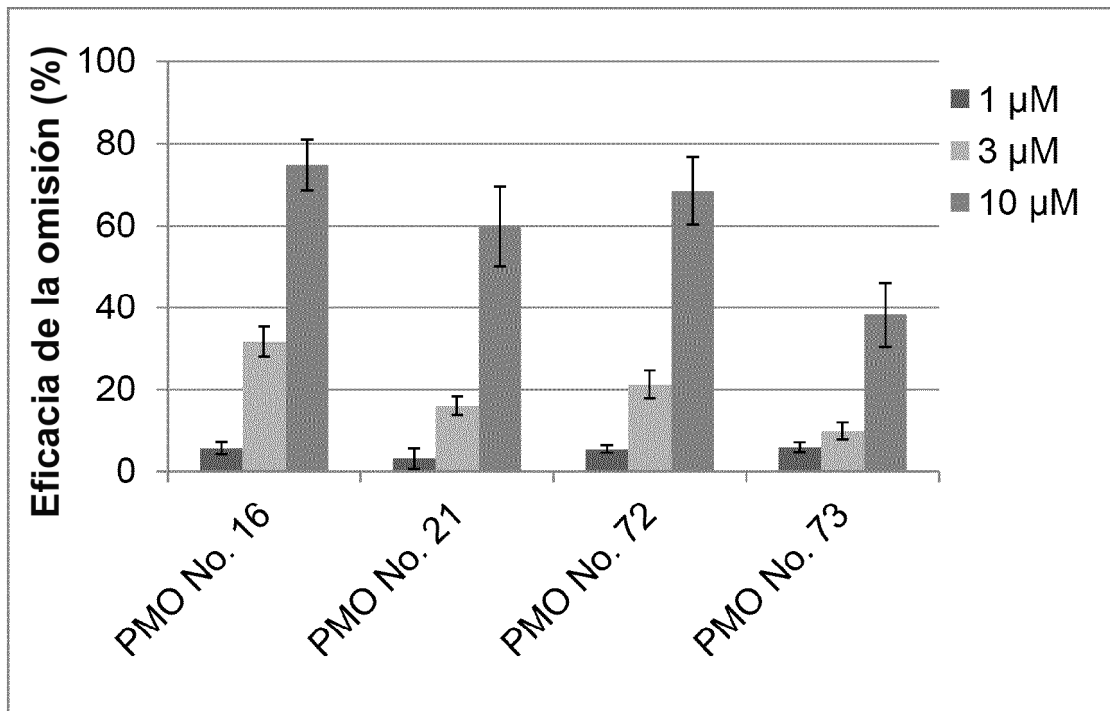


Figura 24

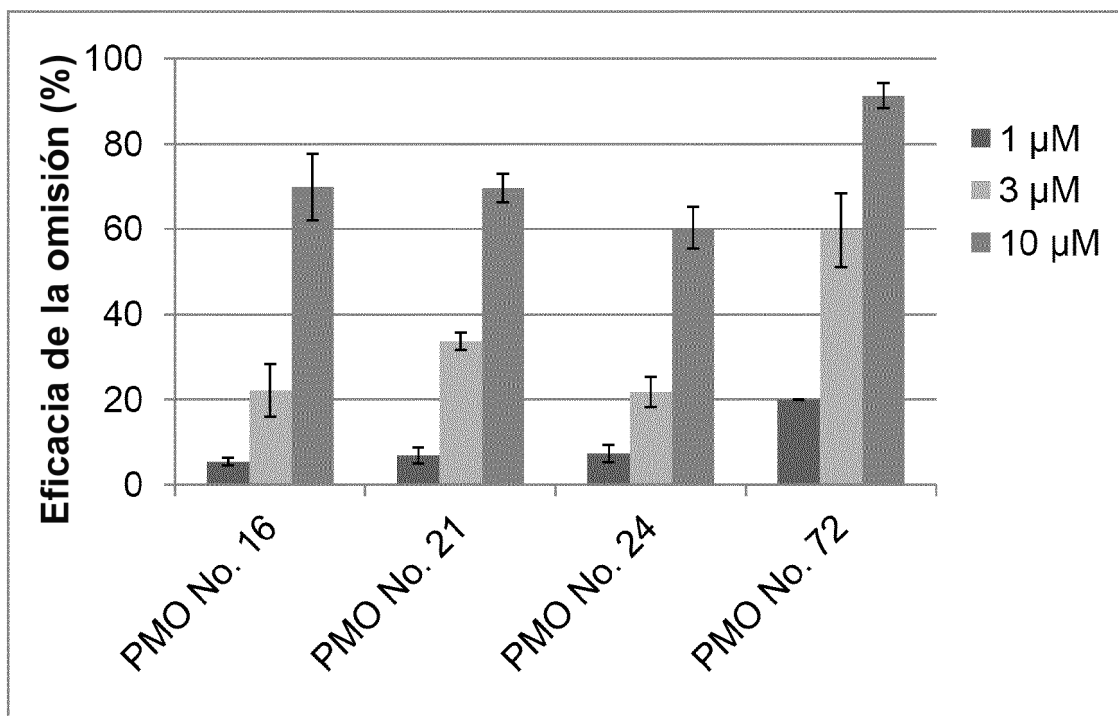


Figura 25

