

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 821 149**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/46 (2006.01)
A61K 38/54 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.03.2015 PCT/US2015/020205**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.09.2015 WO15138739**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.03.2015 E 15761320 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2020 EP 3116533**

(54) Título: **Eliminación del exón del gen de la distrofina mediante nucleasas modificadas genéticamente**

(30) Prioridad:

12.03.2014 US 201461951648 P

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

23.04.2021

(73) Titular/es:

**PRECISION BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
302 East Pettigrew Street, Dibrell Building, Suite
A-100
Durham, NC 27701, US**

(72) Inventor/es:

**JANTZ, DEREK;
SMITH, JAMES JEFFERSON y
NICHOLSON, MICHAEL G.**

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PESES, Gustavo Adolfo

ES 2 821 149 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

Eliminación del exón del gen de la distrofina mediante nucleasas modificadas genéticamente

Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la biología molecular y la tecnología de ácidos nucleicos recombinantes. En particular, la invención se refiere a una composición para su uso en el tratamiento de un paciente con distrofia muscular de Duchenne que comprende la eliminación de un exón del gen de la distrofina usando nucleasas modificadas genéticamente.

Antecedentes de la invención

- 10 La distrofia muscular de Duchenne es un trastorno degenerativo muscular ligado al cromosoma X que afecta aproximadamente a 1 de cada 3500 niños en todo el mundo. La enfermedad es causada por mutaciones en el gen de la distrofina (DMD), que es el gen más grande conocido. DMD abarca 2,2 Mb del cromosoma X y codifica predominantemente un transcripto de 14 kb derivado de 79 exones. La proteína distrofina de longitud completa, tal como se expresa en el músculo esquelético, músculo liso y cardiomiositos, tiene 3685 aminoácidos y un peso molecular de 427 kD. El fenotipo de Duchenne severo generalmente se asocia con la pérdida de la proteína distrofina de longitud completa del músculo esquelético y cardíaco, lo que conduce a una degeneración muscular debilitante y, en última instancia, a insuficiencia cardíaca. Se ha descrito un gran número de mutaciones diferentes de DMD, muchas de las cuales dan como resultado distrofia muscular de Duchenne grave o distrofia muscular de Becker más leve. El Leiden University Medical Center mantiene una base de datos de mutaciones en el gen DMD (<http://www.dmd.nl>).
- 15 Se están siguiendo varias estrategias terapéuticas para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne. Primero, las estrategias de "reemplazo de genes" son un área activa de investigación (Oshima, et al. (2009) *J of the Am. Soc. Of Gene Ther.* 17: 73-80; Liu, et al. (2005) *Mol. Ther.* 11: 245-256; Lai et al. (2006) *Hum Gene Ther.* 17: 1036-1042; Odom et al. (2008) *Mol. Ther.* 16: 1539-1545). Este enfoque implica la administración de una copia funcional del gen DMD a los pacientes usando un vector de administración viral, típicamente virus adenoasociado (AAV). Sin embargo, el gran tamaño del gen DMD lo hace incompatible con la capacidad de transporte limitada de los vectores virales comunes. Esto requiere el uso de un gen de "microdistrofina" en el que la mayor parte de la porción central repetitiva del gen se elimina para dejar solo la proteína funcional mínima. Sin embargo, no está claro que la expresión de "microdistrofina" sea suficiente para obtener un beneficio clínico. Además, este enfoque adolece de la posibilidad de una integración genética aleatoria en el genoma del paciente, lo que podría conducir a una mutagénesis de inserción y al potencial de reacciones inmunes contra el vector de administración.
- 20 30 Un segundo enfoque para tratar la distrofia muscular de Duchenne implica el trasplante de células precursoras musculares sanas en las fibras musculares del paciente (Peault et al. (2007) *Mol. Ther.* 15: 867-877; Skuk, et al. (2007) *Neuromuscul Desorden* 17: 38-46). Este enfoque adolece de una migración ineficaz de los mioblastos trasplantados y del potencial de rechazo inmunitario por parte del paciente.
- 35 40 Un tercer enfoque implica la eliminación de mutaciones sin sentido usando PTC124 (Welch, et al. (2007) *Nature* 447: 87-91). Sin embargo, esto requeriría una dosificación del fármaco de por vida, y el enfoque aún no ha mostrado ningún beneficio clínico significativo.
- 45 50 Un cuarto tratamiento potencial, y más prometedor, para la distrofia muscular de Duchenne se llama "Omisión de Exón" (Williams, et al. (2008) *BMC Biotechnol.* 8:35; Jearawiriyapaisarn et al. (2008) *Mol Ther.* 16: 1624-1629; Yokota, et al. (2007) *Acta Myol.* 26: 179-184; van Deutekom et al. (2001) *Hum. Mol. Gen.* 10: 1547-1554; Benedetti et al. (2013) *FEBS J* 280: 4263-80; Rodino-Klapac (2013) *Curr Neurol Neurosci Rep.* 13: 332; Verhaart and Aartsma-Rus (2012) *Curr Opin Neurol.* 25: 588-96). En general, las porciones N- y C-terminales del gen de la distrofina son esenciales para su papel como una proteína de "andamio" que mantiene la integridad de la membrana en las fibras musculares, mientras que el "dominio de barra" central, que comprende 24 repeticiones de tipo espectrina, es al menos parcialmente dispensable. De hecho, el fenotipo grave de Duchenne se asocia típicamente con mutaciones en el gen de la distrofina que introducen cambios de marco y/o codones de terminación prematura, lo que da como resultado una forma truncada de la proteína distrofina que carece del dominio C-terminal esencial. Las mutaciones en el dominio de la barra central, incluidas las grandes eliminaciones de exones completos, dan como resultado típicamente un fenotipo de Becker mucho más leve si mantienen el marco de lectura de manera que el dominio C-terminal de la proteína esté intacto.
- 55 60 La distrofia muscular de Duchenne es causada con mayor frecuencia por la eliminación de uno o más exones completos, lo que da como resultado un cambio del marco de lectura. Por ejemplo, el exón 45 está eliminado con frecuencia en pacientes con Duchenne. Debido a que el exón 45 tiene 176 pb de largo, que no es divisible entre tres, la eliminación del exón desplaza los exones 46-79 al marco de lectura incorrecto. Lo mismo puede decirse del exón 44, que tiene 148 pb de longitud. Sin embargo, si se eliminan los exones 44 y 45, el tamaño total de la eliminación es 324 pb, que es divisible por tres. Por tanto, la eliminación de ambos exones no da como resultado un cambio del marco de lectura. Debido a que estos exones codifican una parte del dominio de barra no esencial de la proteína distrofina, se espera que eliminarlos de la proteína dé como resultado un fenotipo leve similar a Becker. Por tanto, un paciente con el fenotipo Duchenne debido a la eliminación de uno o más exones puede, potencialmente, ser tratado eliminando

uno o más exones adyacentes para restaurar el marco de lectura. Este es el principio detrás de "Omisión de Exón", en el que se utilizan oligonucleótidos modificados para bloquear los sitios aceptores de empalme en el pre-ARNm de distrofina, de modo que uno o más exones específicos estén ausentes del transcripto procesado. El enfoque se ha utilizado para restaurar la expresión del gen de la distrofina en el modelo de ratón mdx omitiendo el Exón 23, que 5 albergaba una mutación sin sentido inductora de enfermedad (Mann, et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98: 42-47). Los análogos de oligonucleótidos que inducen la omisión del Exón 51 también se han mostrado prometedores en los primeros ensayos clínicos en humanos (Benedetti et al. (2013) FEBS J. 280: 4263-80). Las principales limitaciones 10 de este enfoque son: (1) el proceso de omisión de exón es ineficaz, lo que resulta en niveles relativamente bajos de expresión funcional de distrofina; y (2) el oligonucleótido que omite el exón tiene una vida media relativamente corta, por lo que el efecto es transitorio, lo que requiere una dosificación repetida y de por vida. Por lo tanto, si bien los 15 enfoques de omisión de exones se han mostrado prometedores en los ensayos clínicos, las mejoras en la progresión de la enfermedad han sido mínimas y variables.

La presente invención mejora los enfoques actuales de omisión de exón al corregir la expresión génica al nivel del 20 ADN genómico en lugar de pre-ARNm. La invención es una composición que comprende un par de endonucleasas modificadas genéticamente, específicas de sitio o genes que codifican tales nucleasas, para su uso en un tratamiento permanente para la distrofia muscular de Duchenne que implica la escisión de exones específicos de la secuencia codificante de DMD. Dirigiendo un par de tales endonucleasas a sitios en las regiones intrónicas que flanquean un exón, es posible eliminar permanentemente el fragmento intermedio que contiene el exón del genoma. La célula resultante y su progenie expresarán distrofina mutante en la que se elimina una porción del dominio de repetición de 25 espectrina no esencial, pero los dominios N- y C-terminales esenciales están intactos.

Se conocen en la técnica procedimientos para producir endonucleasas específicas de sitio modificadas genéticamente. 30 Por ejemplo, las nucleasas de dedos de zinc (ZFN) pueden ser modificadas genéticamente para reconocer y cortar sitios predeterminados en un genoma. Las ZFN son proteínas quiméricas que comprenden un dominio de unión al ADN con dedos de zinc fusionado al dominio nucleasa de la enzima de restricción FokI. El dominio del dedo de zinc se puede rediseñar mediante medios racionales o experimentales para producir una proteína que se une a una secuencia de ADN predeterminada de aproximadamente 18 pares de bases de longitud. Al fusionar este dominio de 35 proteína modificada genéticamente a la nucleasa FokI, es posible apuntar a rupturas de ADN con especificidad a nivel de genoma. Las ZFN se han utilizado ampliamente para seleccionar como diana la adición, eliminación y sustitución de genes en una amplia gama de organismos eucariotas (revisado en S. Durai et al., Nucleic Acids Res 33, 5978 (2005)). Asimismo, se pueden generar nucleasas efectoras de TAL (TALEN) para escindir sitios específicos en el ADN 40 genómico. Al igual que un ZFN, un TALEN comprende un dominio de unión a ADN específico de un sitio modificado genéticamente fusionado al dominio de nucleasa FokI (revisado en Mak, et al. (2013) Curr Opin Struct Biol. 23: 93-9). En este caso, sin embargo, el dominio de unión al ADN comprende una matriz en tandem de dominios efectores de TAL, cada uno de los cuales reconoce específicamente un único par de bases de ADN. Una limitación que tienen las 45 ZFN y TALEN para la práctica de la presente invención es que son heterodiméricas, de modo que la producción de una única nucleasa funcional en una célula requiere la coexpresión de dos monómeros proteicos. Debido a que la presente invención requiere dos nucleasas, una para cortar a cada lado del exón de interés, esto necesitaría coexpresar cuatro monómeros de ZFN o TALEN en la misma célula. Esto presenta desafíos importantes en la administración de genes porque los vectores de administración de genes tradicionales tienen una capacidad de carga limitada. También introduce la posibilidad de una "dimerización errónea" en la que los monómeros se asocian de manera inapropiada para producir especies de endonucleasas diméricas no deseadas que podrían reconocer y cortar las ubicaciones diana en el genoma. Esto puede, potencialmente, minimizarse generando heterodímeros ortogonales obligados en los que los dominios de nucleasa FokI de los cuatro monómeros se modifican genéticamente 50 diferencialmente para dimerizar preferentemente con el monómero asociado pretendido.

55 Los Compact TALEN son una arquitectura de endonucleasa alternativa que evita la necesidad de dimerización (Beurdeley, et al. (2013) Nat Commun. 4: 1762). Un Compact TALEN comprende un dominio de unión a ADN efector de TAL específico de sitio, modificado genéticamente, fusionado al dominio de nucleasa de la endonucleasa de anidamiento de I-TevI. A diferencia de FokI, I-TevI no necesita dimerizarse para producir una ruptura de ADN de doble hebra, por lo que Compact TALEN es funcional como monómero. Por tanto, es posible coexpresar dos Compact 60 TALEN en la misma célula para poner en práctica la presente invención.

Las endonucleasas modificadas genéticamente basadas en el sistema CRISPR/Cas9 también se conocen en la técnica (Ran, et al. (2013) Nat Protoc. 8: 2281-2308; Mali et al. (2013) Nat Methods. 10: 957-63). Una endonucleasa CRISPR comprende dos componentes: (1) una nucleasa efectora de caspasa, típicamente Cas9 microbiana; y (2) un "ARN guía" corto que comprende una secuencia de direccionamiento de ~20 nucleótidos que dirige la nucleasa a una ubicación de interés en el genoma. Al expresar múltiples ARN guía en la misma célula, cada uno con una secuencia de direccionamiento diferente, es posible apuntar rupturas de ADN simultáneamente a múltiples sitios en el genoma. Por tanto, las nucleasas CRISPR/Cas9 son adecuadas para la presente invención. El principal inconveniente del sistema CRISPR/Cas9 es su alta frecuencia informada de rupturas del ADN fuera de la diana, lo que podría limitar la utilidad del sistema para tratar pacientes humanos (Fu, et al. (2013) Nat Biotechnol. 31: 822-6).

65 En la realización preferida de la invención, el agente inductor de la ruptura del ADN es una endonucleasa de anidamiento modificada genéticamente (también denominada "meganucleasa"). Las endonucleasas de anidamiento son un grupo de nucleasas de origen natural que reconocen sitios de escisión de 15-40 pares de bases que se

encuentran comúnmente en los genomas de plantas y hongos. Con frecuencia se asocian con elementos de ADN parásitos, como los intrones e inteínas de autoempalme del grupo 1. Promueven de forma natural la recombinación homóloga o la inserción de genes en ubicaciones específicas del genoma del huésped al producir una ruptura de doble hebra en el cromosoma, que recluta la maquinaria de reparación del ADN celular (Stoddard (2006), Q. Rev. Biophys. 38: 49-95). Las endonucleasas de anidamiento se agrupan comúnmente en cuatro familias: la familia LAGLIDADG, la familia GIY-YIG, la familia de cajas His-Cys y la familia HNH. Estas familias se caracterizan por motivos estructurales que afectan la actividad catalítica y la secuencia de reconocimiento. Por ejemplo, los miembros de la familia LAGLIDADG se caracterizan por tener una o dos copias del motivo LAGLIDADG conservado (véase Chevalier et al. (2001), Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774). Las endonucleasas de anidamiento de LAGLIDADG con una única copia del motivo LAGLIDADG forman homodímeros, mientras que los miembros con dos copias del motivo LAGLIDADG se encuentran como monómeros.

I-Crel (SEQ ID NO: 1) es un miembro de la familia LAGLIDADG de endonucleasas de anidamiento que reconoce y corta una secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases en el cromosoma del cloroplaso del alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Se han utilizado técnicas de selección genética para modificar la preferencia del sitio de escisión I-Crel de tipo silvestre (Sussman et al. (2004), J. Mol. Biol. 342: 31-41; Chames et al. (2005), Nucleic Acids Res 33: e178; Seligman et al. (2002), Nucleic Acids Res. 30: 3870-9, Arnould et al. (2006), J. Mol. Biol. 355: 443-58). Más recientemente, se describió un procedimiento de diseño racional de endonucleasas de anidamiento mono-LAGLIDADG que es capaz de rediseñar de forma integral I-Crel y otras endonucleasas de anidamiento para apuntar a sitios de ADN ampliamente divergentes, incluidos sitios en genomas de mamíferos, levaduras, plantas, bacterias y virus. (WO 2007/047859).

Como se describió por primera vez en el documento WO 2009/059195, I-Crel y sus derivados modificados genéticamente son normalmente diméricos pero se pueden fusionar en un solo polipéptido usando un enlazador peptídico corto que une el extremo C-terminal de una primera subunidad al extremo N-terminal de una segunda subunidad (Li, et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37: 1650-62; Grizot, et al. (2009) Nucleic Acids Res. 37: 5405-19.) Por lo tanto, una meganucleasa funcional "monocatenaria" se puede expresar a partir de una única transcripción. Al administrar genes que codifican dos meganucleasas monocatenarias diferentes a la misma célula, es posible cortar simultáneamente dos sitios diferentes. Esto, junto con la frecuencia extremadamente baja de cortes fuera de la diana observada con las meganucleasas modificadas genéticamente las convierte en la endonucleasa preferida para la presente invención.

El uso de meganucleasas modificadas genéticamente para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne se describió previamente en el documento WO 2011/141820 (la solicitud '820). En esta solicitud de patente, los autores discuten la posibilidad de utilizar meganucleasas modificadas genéticamente para corregir defectos en el gen DMD a través de tres mecanismos diferentes (véase WO 2011/141820 Figura 1). Primero, los autores contemplan el uso de una meganucleasa modificada genéticamente para insertar una copia transgénica de DMD o micro-DMD en un locus de "puerto seguro", como AAVS1, donde se expresará de forma constitutiva sin afectar la expresión génica endógena. En segundo lugar, los autores proponen que se podría hacer una meganucleasa para escindir el genoma en un sitio cerca de una mutación deletérea en la DMD y que esta ruptura del ADN estimularía la recombinación homóloga entre el gen DMD mutante en el genoma y una copia sana del gen proporcionado en trans de manera que se corrija la mutación en el genoma. En tercer lugar, los autores de la solicitud '820 proponen que se puede hacer una meganucleasa modificada genéticamente para insertar ADN extraño en un intrón en el gen DMD y que tal meganucleasa podría usarse para insertar el dominio C-terminal esencial de la distrofina en un intrón temprano corriente arriba de una mutación que causa una enfermedad. Significativamente, al contemplar los innumerables usos de las meganucleasas para manipular el gen DMD, los autores de la solicitud '820 no contemplan el uso de dos meganucleasas simultáneamente en las mismas células, ni proponen la eliminación de ninguna secuencia de ADN como en la presente invención.

Finalmente, Ousterout et al. demostró que una ruptura del ADN puede dirigirse a la secuencia codificante de DMD utilizando un TALEN y que la ruptura se repara con frecuencia a través de la vía mutagénica de unión de extremos no homólogos, lo que da como resultado la introducción de pequeñas inserciones y/o eliminaciones ("indeles") que puede cambiar el marco de lectura del gen (Ousterout et al. (2013) Mol Ther. 21: 1718-26). Demostraron la posibilidad de restaurar la expresión del gen DMD en una parte de las células mutantes mediante la administración de una ruptura del ADN al exón inmediatamente después de la mutación y confiando en la reparación del ADN mutagénico para restaurar el marco de lectura en algún porcentaje de células. A diferencia de la presente invención, este enfoque involucró una sola nucleasa y se dirigió a la secuencia codificante del gen.

El documento US 2012/301456 A1 describe un procedimiento para tratar la distrofia muscular de Duchenne induciendo una ruptura de doble hebra dentro del gen de la distrofina humana y confiando en la unión de extremos no homólogos para reparar una mutación que causa la enfermedad.

El documento CA 2878645 A1 describe un procedimiento para tratar la distrofia muscular de Duchenne induciendo una ruptura de doble hebra dentro del gen de la distrofina humana y usando una plantilla de reparación para reparar una mutación que causa la enfermedad por medio de recombinación homóloga.

60 Sumario de la invención

La invención está definida por las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención es una composición que comprende un par de nucleasas modificadas genéticamente, o genes que codifican un par de nucleasas modificadas genéticamente, para su uso en un procedimiento de tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne, en el que las dos nucleasas son capaces de escindir un exón del gen DMD, para restaurar el marco de lectura normal. La primera nucleasa corta una primera secuencia de reconocimiento dentro de un intrón que es adyacente y 5' corriente arriba del exón. La segunda nucleasa corta una segunda secuencia de reconocimiento dentro de un intrón que es adyacente y 3' corriente abajo del exón. La primera secuencia de reconocimiento y la segunda secuencia de reconocimiento tienen salientes complementarias cuando se cortan por dicha primera nucleasa y dicha segunda nucleasa. Las células así tratadas expresarán una forma abreviada de la proteína distrofina en la que una parte del dominio central de repetición de la espectrina está ausente pero los dominios N- y C-terminales están intactos. Esto, en muchos casos, reducirá la gravedad de la enfermedad al fenotipo leve de Becker.

Se divulga un procedimiento general para tratar la distrofia muscular de Duchenne usando un par de nucleasas. También se divultan meganucleasas modificadas genéticamente adecuadas para practicar el procedimiento. Además, se divultan Compact TALEN modificados genéticamente adecuados para practicar el procedimiento. También se divultan CRISPR para practicar el procedimiento. Se divultan además vectores y técnicas para administrar nucleasas modificadas genéticamente a células de pacientes.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Estructura del gen DMD. Se dibujan 79 exones para indicar el marco de lectura. Se indican los dominios de unión a actina y de unión a distroglicano esenciales, que abarcan aproximadamente los exones 2-8 y 62-70, respectivamente.

Figura 2. Estrategias para eliminar exones del gen DMD utilizando diferentes tipos de nucleasas. 2A) Estrategia para eliminar un exón utilizando un par de CRISPR. Se utilizan un par de "ARN guía" ("ARNg") que son complementarios a un par de sitios de reconocimiento que flanquean el exón de interés. Como se muestra en esta figura, los ARNg pueden ser complementarios a las secuencias de reconocimiento que están distales al motivo "GG" conservado y al sitio de escisión del ADN de Cas9. En esta orientación, las secuencias de reconocimiento de CRISPR se conservan en gran medida después de la escisión del ADN, la escisión del fragmento intermedio de ADN genómico y la reunión de los extremos del cromosoma. 2B) Un esquema alternativo para eliminar un exón usando un par de CRISPR en el que los ARNg son complementarios a las secuencias de reconocimiento que están próximas al exón. En esta orientación, las secuencias de reconocimiento de CRISPR se eliminan en gran medida después de la escisión del ADN, la escisión del fragmento intermedio de ADN genómico y la reunión de los extremos del cromosoma. Se contempla en la invención que también podría comprender un híbrido de los esquemas mostrados en 2A y 2B. 2C) Estrategia para eliminar un exón utilizando un par de Compact TALEN (cTALEN). Se utilizan un par de dominios de unión al ADN efector de TAL ("TALE") que se unen a un par de sitios de reconocimiento que flanquean el exón de interés. Como se dibuja en esta figura, los TALE pueden unirse a secuencias de reconocimiento que están distales al motivo conservado "CNNNG" que es reconocido y cortado por el dominio de escisión I-Tevl ("Tevl-CD"). En esta orientación, las secuencias de reconocimiento de cTALEN se conservan en gran medida después de la escisión del ADN, la escisión del fragmento intermedio del ADN genómico y la reunión de los extremos del cromosoma. Además, los cTALEN de esta figura se muestran con los dominios TALE y Tevl-CD en una orientación N a C. También es posible generar cTALEN con estos dos dominios en una orientación C- a N-. 2D) Un esquema alternativo para eliminar un exón usando un par de cTALEN en el que los dominios TALE se unen a secuencias de reconocimiento que están próximas al exón. En esta orientación, las secuencias de reconocimiento de cTALEN se eliminan en gran medida después de la escisión del ADN, la escisión del fragmento intermedio de ADN genómico y la reunión de los extremos del cromosoma. Además, los cTALEN en esta figura se dibujan con los dominios TALE y Tevl-CD en una orientación C- a N-. Se contempla en la invención que también podría comprender un híbrido de los esquemas mostrados en 2C y 2D. 2E) Estrategia para eliminar un exón del gen DMD utilizando un par de meganucleasas monocatenarias. Las meganucleasas se dibujan como proteínas de dos dominios (MGN-N: el dominio N-terminal; y MGN-C: el dominio C-terminal) unidas por un enlazador. En la figura, el dominio C-terminal se dibuja como unión a la mitad de la secuencia de reconocimiento que está más cerca del exón. En algunas realizaciones, sin embargo, el dominio N-terminal puede unirse a esta mitad de la secuencia de reconocimiento. Los cuatro pares de bases centrales de la secuencia de reconocimiento se muestran como "NNNN". Estos cuatro pares de bases se convierten en "salientes" en 3' de una sola hebra después de la escisión por la meganucleasa. El subconjunto de secuencias de cuatro pares de bases preferidas que comprenden esta región de la secuencia se identifica en el documento WO/2010/009147. La escisión del ADN por el par de meganucleasas genera un par de salientes 3' de cuatro pares de bases en los extremos del cromosoma. Si estos salientes son complementarios, pueden aparearse entre sí y volver a ligarse directamente, lo que da como resultado que la secuencia de cuatro pares de bases se retenga en el cromosoma después de la escisión del exón. Debido a que las meganucleasas se escinden cerca de la mitad de la secuencia de reconocimiento, la mitad de cada secuencia de reconocimiento se retendrá frecuentemente en el cromosoma después de la escisión del exón. La otra mitad de cada secuencia de reconocimiento se eliminará del genoma con el exón.

Figura 3. Escisión del exón 44 de DMD usando las meganucleasas DYS-1/2 y DYS-3/4. 3A) Secuencia de DMD Exón 44 y regiones flanqueantes. La secuencia del exón está subrayada. Los sitios de reconocimiento para las meganucleasas DYS-1/2 y DYS-3/4 están sombreados en gris con los cuatro pares de bases centrales (que se convierten en el saliente 3' después de la escisión por la meganucleasa) en negrita. Los sitios de fusión para un par de cebadores de PCR utilizados para el análisis están en cursiva. 3B) Análisis de electroforesis en gel de agarosa de células HEK-293 que coexpresan DYS-1/2 y DYS-3/4. El ADN genómico se aisló de las células y se evaluó mediante PCR utilizando los cebadores indicados en (3A). Los productos de PCR se resolvieron en un gel de agarosa y se encontró que las células HEK-293 que coexpresaban las dos meganucleasas produjeron un par de bandas de PCR mientras que las células HEK-293 de tipo silvestre produjeron solo la banda más grande. 3C) secuencias de tres plásmidos que albergan el producto de PCR más pequeño de (3B). Las tres secuencias se muestran alineadas con la secuencia humana de tipo silvestre. Las ubicaciones de las secuencias de reconocimiento DYS-1/2 y DYS-3/4 están sombreadas en gris con los cuatro pares de bases centrales en negrita.

Figura 4. Escisión del exón 45 de DMD usando las meganucleasas DYS-5/6 y DYS-7/8. 4A) Secuencia de DMD Exón 45 y regiones flanqueantes. La secuencia del exón está subrayada. Los sitios de reconocimiento para las meganucleasas DYS-5/6 y DYS-7/8 están sombreados en gris con los cuatro pares de bases centrales (que se convierten en el saliente 3' después de la escisión por la meganucleasa) en negrita. Los sitios de fusión para un par de cebadores de PCR utilizados para el análisis están en cursiva. 4B) Análisis de electroforesis en gel de agarosa de células HEK-293 que coexpresan DYS-5/6 y DYS-7/8. El ADN genómico se aisló de las células y se evaluó mediante PCR utilizando los cebadores indicados en (4A). Los productos de la PCR se resolvieron en un gel de agarosa y se encontró que las células HEK-293 que coexpresaban las dos meganucleasas produjeron un par de bandas de PCR, mientras que las células HEK-293 de tipo silvestre produjeron solo la banda más grande. 4C) secuencias de 16 plásmidos que albergan el producto de PCR más pequeño de (4B). Las secuencias se muestran alineadas con la secuencia humana de tipo silvestre. Las ubicaciones de las secuencias de reconocimiento DYS-5/6 y DYS-7/8 están sombreadas en gris con los cuatro pares de bases centrales en negrita.

Figura 5. Evaluación de las meganucleasas MDX-1/2 y MDX-13/14 en un ensayo indicador en células CHO. A) Esquema del ensayo. Para cada una de las dos meganucleasas, producimos una línea celular CHO en la que se integró de manera estable un casete indicador en el genoma de la célula. El casete informador comprendía, en orden de 5' a 3': un promotor temprano SV40; el 5' 2/3 del gen GFP; el sitio de reconocimiento para MDX-1/2 (SEQ ID NO: 149) o el sitio de reconocimiento para MDX-13/14 (SEQ ID NO: 150); el sitio de reconocimiento para la meganucleasa CHO-23/24 (WO/2012/167192); y el 3' 2/3 del gen GFP. Las células transfectadas de forma estable con este casete no expresaron GFP en ausencia de un agente inductor de la ruptura del ADN. Sin embargo, cuando se indujo una ruptura del ADN en cualquiera de los sitios de reconocimiento de meganucleasa, las regiones duplicadas del gen GFP se recombinaron entre sí para producir un gen GFP funcional. El porcentaje de células que expresan GFP podría determinarse luego mediante citometría de flujo como una medida indirecta de la frecuencia de escisión del genoma por las meganucleasas. B, C) Las dos líneas indicadoras de CHO se transfectaron con ARNm que codifica las meganucleasas MDX-1/2 (A), MDX-13/14 (B) o CHO-23/34 (A y B). Se transfectaron 1,5e6 células CHO con 1e6 copias de ARNm por célula usando un Nucleofector 2 de Lonza y el programa U-024 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, las células se evaluaron mediante citometría de flujo para determinar el porcentaje de células positivas para GFP en comparación con un control negativo no transfectado (vacío). El ensayo se realizó por triplicado y se muestran las desviaciones estándar. Se encontró que las meganucleasas MDX-1/2 y MDX-13/14 producen células GFP+ en sus respectivas líneas celulares a frecuencias que exceden significativamente tanto el control negativo (vacío) como el control positivo CHO-23/24, lo que indica que las nucleasas son capaces de reconocer y cortar de manera eficiente sus secuencias diana previstas en una célula.

Figura 6. Alineamientos de secuencia de 20 clones de mioblastos de ratón C2C12 en los que una porción del gen DMD se eliminó mediante cotransfección con las meganucleasas MDX-1/2 y MDX-13/14. La ubicación del Exón 23 de DMD se muestra al igual que las ubicaciones y secuencias de los sitios diana MDX-1/2 y MDX-13/14. Cada una de las 20 secuencias (SEQ ID NO: 153-172) se alineó con una secuencia de DMD de tipo silvestre de referencia y las eliminaciones relativas a la referencia se muestran como barras huecas.

Figura 7. Mapa de vectores del plásmido pAAV-MDX. Este plásmido de "empaquetamiento" se usó junto con un plásmido auxiliar de Ad para producir virus AAV capaz de administrar simultáneamente los genes que codifican las meganucleasas MDX-1/2 y MDX-13/14.

Descripción detallada de la invención

1.1 Referencias y definiciones

Como se usa en este documento, el término "meganucleasa" se refiere a una endonucleasa que se deriva de I-Crel. El término meganucleasa, como se usa en este documento, se refiere a una variante modificada genéticamente de I-Crel que se ha modificado con respecto a la I-Crel natural con respecto a, por ejemplo, especificidad de unión al ADN, actividad de escisión del ADN, afinidad de unión al ADN o propiedades de dimerización. Los procedimientos para producir tales variantes modificadas de I-Crel se conocen en la técnica (por ejemplo, WO 2007/047859). Una meganucleasa puede unirse al ADN de doble hebra como un homodímero, como es el caso del I-Crel de tipo silvestre,

o puede unirse al ADN como un heterodímero. Una meganucleasa también puede ser una "meganucleasa monocatenaria" en la que un par de dominios de unión a ADN derivados de I-Crel se unen en un único polipéptido usando un enlazador peptídico.

5 Como se usa en este documento, el término "meganucleasa monocatenaria" se refiere a un polipéptido que comprende un par de subunidades de meganucleasa unidas por un enlazador. Una meganucleasa monocatenaria tiene la organización: subunidad N-terminal - Enlazador - subunidad C-terminal. Las dos subunidades de meganucleasa, cada una de las cuales se deriva de I-Crel, generalmente no serán idénticas en la secuencia de aminoácidos y reconocerán secuencias de ADN no idénticas. Por tanto, las meganucleasas monocatenarias escinden típicamente secuencias de reconocimiento pseudopalindrómicas o no palindrómicas. Una meganucleasa monocatenaria puede denominarse "heterodímero monocatenario" o "meganucleasa heterodimérica monocatenaria" aunque, de hecho, no es dimérica. Para mayor claridad, a menos que se especifique lo contrario, el término "meganucleasa" puede referirse a una meganucleasa dimérica o monocatenaria.

10 15 Como se usa en este documento, el término "Compact TALEN" se refiere a una endonucleasa que comprende un dominio de unión a ADN con 16-22 repeticiones de dominio TAL fusionadas en cualquier orientación a cualquier porción de la endonucleasa de anidamiento de I-Tevl.

20 25 Como se usa en este documento, el término "CRISPR" se refiere a una endonucleasa basada en caspasa que comprende una caspasa, tal como Cas9, y un ARN guía que dirige la escisión del ADN de la caspasa hibridando con un sitio de reconocimiento en el ADN genómico.

30 35 Como se usa en este documento, con respecto a una proteína, el término "recombinante" significa que tiene una secuencia de aminoácidos alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética a los ácidos nucleicos que codifican la proteína, y las células u organismos que expresan la proteína. Con respecto a un ácido nucleico, el término "recombinante" significa que tiene una secuencia de ácido nucleico alterada como resultado de la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Las técnicas de ingeniería genética incluyen, entre otras, tecnologías de clonación de ADN y PCR; transfección, transformación y otras tecnologías de transferencia de genes; recombinación homóloga; mutagénesis dirigida al sitio; y fusión de genes. De acuerdo con esta definición, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a una proteína de origen natural, pero producida por clonación y expresión en un huésped heterólogo, no se considera recombinante.

40 45 Como se usa en el presente documento, el término "tipo silvestre" se refiere a cualquier forma natural de una meganucleasa. El término "tipo silvestre" no pretende significar la variante alélica más común de la enzima en la naturaleza sino, más bien, cualquier variante alélica encontrada en la naturaleza. Las endonucleasas de anidamiento de tipo silvestre se distinguen de las meganucleasas recombinantes o no naturales.

50 55 Como se usa en este documento, el término "secuencia de reconocimiento" se refiere a una secuencia de ADN que está unida y es escindida por una endonucleasa. En el caso de una meganucleasa, una secuencia de reconocimiento comprende un par de "medios sitios" invertidos de 9 pares de bases que están separados por cuatro pares de bases. En el caso de una meganucleasa monocatenaria, el dominio N-terminal de la proteína contacta con un primer medio sitio y el dominio C-terminal de la proteína contacta con un segundo medio sitio. La escisión por una meganucleasa produce cuatro "salientes" 3' de pares de bases. Los "salientes" o "extremos pegajosos" son segmentos cortos de ADN monocatenario que pueden producirse mediante escisión por endonucleasa de una secuencia de ADN bicatenario. En el caso de meganucleasas y meganucleasas monocatenarias derivadas de I-Crel, el saliente comprende las bases 10-13 de la secuencia de reconocimiento de 22 pares de bases. En el caso de un Compact TALEN, la secuencia de reconocimiento comprende una primera secuencia CNNNGN que es reconocida por el dominio I-Tevl, seguida de un espaciador no específico de 4-16 pares de bases de longitud, seguido de una segunda secuencia de 16-22 pb en longitud que es reconocida por el dominio efector TAL (esta secuencia típicamente tiene una base 5' T). La división por un Compact TALEN produce dos salientes de 3' pares de bases. En el caso de un CRISPR, la secuencia de reconocimiento es la secuencia, normalmente de 16 a 24 pares de bases, a la que se une el ARN guía para dirigir la escisión de Cas9. La escisión por un CRISPR produjo extremos romos.

Como se usa en este documento, el término "sitio diana" o "secuencia diana" se refiere a una región del ADN cromosómico de una célula que comprende una secuencia de reconocimiento para una meganucleasa.

Como se usa en este documento, el término "recombinación homóloga" o "HR" se refiere al proceso celular natural en el que se repara una ruptura de ADN de doble hebra usando una secuencia de ADN homóloga como plantilla de reparación (véase, por ejemplo, Cahill et al. al. (2006), *Front. Biosci.* 11: 1958-1976). La secuencia de ADN homóloga puede ser una secuencia cromosómica endógena o un ácido nucleico exógeno que se suministró a la célula.

50 55 Como se usa en el presente documento, el término "unión de extremos no homólogos" o "NHEJ" se refiere al proceso celular natural en el que se repara una ruptura de ADN de doble hebra mediante la unión directa de dos segmentos de ADN no homólogos. (véase, por ejemplo, Cahill et al. (2006), *Front. Biosci.* 11: 1958-1976). La reparación del ADN por unión de extremos no homólogos es propensa a errores y con frecuencia da como resultado la adición o eliminación no planificada de secuencias de ADN en el sitio de reparación.

Como se usa en este documento, el término "religación" se refiere a un proceso en el que dos extremos de ADN

producidos por un par de rupturas de ADN de doble hebra se unen covalentemente entre sí con la pérdida de la secuencia de ADN interviniente, pero sin la ganancia o pérdida de cualquier secuencia de ADN adicional. En el caso de un par de rupturas de ADN que se producen con salientes de una sola hebra, la nueva ligación puede proceder mediante el apareamiento de salientes complementarias seguido de la unión covalente de los extremos 5' y 3' mediante un ADN ligasa. La nueva ligación se distingue de NHEJ en que no da como resultado la adición o eliminación no planificada de ADN del sitio de reparación.

Como se usa en el presente documento, a menos que se indique específicamente lo contrario, la palabra "o" se usa en el sentido inclusivo de "y/o" y no en el sentido exclusivo de "uno u otro".

2.1 Principio de eliminación de exones

La presente invención se basa, en parte, en la hipótesis de que ciertas eliminaciones en el gen DMD que dan lugar al fenotipo Duchenne se pueden compensar eliminando uno o más exones adicionales inmediatamente arriba o debajo de la mutación. La base de datos DMD-Leiden indica que la mayoría de las mutaciones que causan la distrofia muscular de Duchenne son eliminaciones de uno o más exones completos que provocan un cambio en el marco de lectura. En muchos casos, el marco de lectura se puede restaurar eliminando el exón inmediatamente antes o después de la mutación. Como se muestra en la Tabla 1, 29 diferentes mutaciones causantes de Duchenne, que representan aproximadamente el 65% de los pacientes, pueden compensarse eliminando un solo exón adyacente a la mutación. Por ejemplo, un paciente con enfermedad debido a la eliminación del Exón 45 de DMD, que ocurre en aproximadamente el 7% de los pacientes, puede tratarse con un tratamiento que elimina el Exón 46. En particular, un tratamiento capaz de eliminar el Exón 51 o el Exón 45 podría ser utilizado para tratar el 15% y el 13% de los pacientes, respectivamente.

Tabla 1

| Exón(es) eliminado en el paciente | Exón adicional para eliminar | Frecuencia en la base de datos DMD-Leiden (%) |
|--|------------------------------|---|
| 44, 44-47 | 43 | 5 |
| 35-43, 45, 45-54 | 44 | 8 |
| 18-44, 44, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53 | 45 | 13 |
| 45 | 46 | 7 |
| 51, 51-55 | 50 | 5 |
| 50, 45-50, 48-50, 49-50, 52, 52-63 | 51 | 15 |
| 51, 53, 53-55 | 52 | 3 |
| 45-52, 48-52, 49-52, 50-52, 52 | 53 | 9 |

2.2 Nucleasas para eliminación de exones

Se sabe en la técnica que es posible usar una nucleasa de sitio específico para hacer una ruptura del ADN en el genoma de una célula viva y que dicha ruptura del ADN puede resultar en una modificación permanente del genoma mediante reparación de NHEJ mutagénico o a través de HR con una secuencia de ADN transgénico. Sin embargo, la presente invención implica la coexpresión de un par de nucleasas en la misma célula. Sorprendentemente, descubrimos que un par de nucleasas dirigidas a sitios de ADN muy próximos entre sí (con menos de 10.000 pares de bases de separación) pueden eliminar el fragmento de ADN intermedio del genoma. También sorprendentemente, encontramos que la escisión de ADN usando un par de nucleasas procede con frecuencia a través de un mecanismo que involucra los salientes de ADN monocatenarios generados por las nucleasas. En experimentos que implican un par de meganucleasas que generan salientes de ADN complementarias (es decir, idénticas), se encontró que la secuencia de salientes se conservaba frecuentemente después de la escisión del fragmento y la reparación de los extremos del cromosoma resultantes (véanse Ejemplos 1 y 2). El mecanismo de reparación del ADN, en este caso, parece dirigir la ligación de los extremos rotos, lo que no se ha observado en células de mamíferos. No se observó tal eliminación y religación precisas cuando se usó un par de meganucleasas que generaron salientes no idénticas (véase Ejemplo 3). Por tanto, el par de nucleasas utilizadas para la escisión del exón de DMD se selecciona para generar salientes complementarias.

Para escindir un exón de manera eficaz, el par de sitios de corte de nucleasa deben estar relativamente juntos. En general, cuanto más cerca estén los dos sitios, más eficiente será el proceso. Por lo tanto, la realización preferida de la invención usa un par de nucleasas que cortan secuencias que tienen menos de 10.000 pares de bases o, más preferiblemente, 5.000 pares de bases o, aún más preferiblemente, menos de 2.500 pares de bases, o, lo más

preferiblemente, menos de 1.500 pares de bases separados.

Como se muestra en la Figura 2, una variedad de diferentes tipos de nucleasa son útiles para poner en práctica la invención. Las Figuras 2A y 2B muestran ejemplos de cómo se puede practicar la invención usando un par de nucleasas CRISPR. En este caso, la invención se puede poner en práctica administrando tres genes a la célula: un

5 gen que codifica la proteína Cas9 y un gen que codifica cada uno de los dos ARN guía. Los CRISPR escinden el ADN para dejar extremos romos que generalmente no se vuelven a ligar de forma limpia, de modo que el producto final generalmente tendrá mutaciones de inserción y/o eliminación ("indel") adicionales en la secuencia. En una realización alternativa, se puede usar una "Nickasa CRISPR", como se informa en Ran, et al. (2013) Cell. 154: 1380-9. Para practicar esta realización, es necesario expresar cuatro ARN guía en la célula, dos de los cuales son complementarios 10 a la secuencia cadena arriba del exón y dos de los cuales son complementarios a la secuencia corriente abajo del exón. En esta realización, los dos pares de ARN guía se hibridan con hebras complementarias en la región diana y cada miembro del par produce una muesca de ADN de hebra única en una de las hebras. El resultado es un par de muescas (equivalente a una ruptura de doble hebra) que se pueden desplazar entre sí para producir un saliente de una hebra que es ventajoso para la práctica de la invención. Se conocen en la técnica procedimientos para fabricar 15 CRISPR y Nickasas CRISPR que reconocen sitios de ADN predeterminados, por ejemplo, Ran, et al. (2013) Nat Protoc.. 8: 2281-308.

En realizaciones alternativas, como se muestra en el diagrama de la Figura 2C y 2D, el par de nucleasas puede ser Compact TALEN. Un Compact TALEN comprende un dominio de unión al ADN efector de TAL (TALE) fusionado en su extremo N- o C-terminal al dominio de escisión de I-TevI, que comprende al menos los residuos 1-96 y preferiblemente los residuos 1-182 de I-TevI. El dominio de escisión I-TevI reconoce y corta secuencias de ADN de la forma 5'-CNbNNtG-3', donde "b" representa el sitio de escisión de la hebra inferior y "t" representa el sitio de escisión de la hebra superior y donde "N" es cualquiera de las cuatro bases. Un Compact TALEN, por lo tanto, se escinde para producir dos salientes de 3' pares de bases. En una realización preferida, el par Compact TALEN usado para la escisión del exón se selecciona para que tenga salientes complementarias que puedan religar directamente. Los procedimientos para preparar dominios TALE que se unen a sitios de ADN predeterminados son conocidos en la técnica, por ejemplo, Reyen et al. (2012) Nat Biotechnol. 30: 460-5.

En la realización preferida, como se muestra en el diagrama de la Figura 2E, las nucleasas utilizadas para practicar la invención son un par de meganucleasas monocatenarias. Una meganucleasa monocatenaria comprende un dominio N-terminal y un dominio C-terminal unidos por un péptido enlazador. Cada uno de los dos dominios reconoce la mitad de la secuencia de reconocimiento y el sitio de escisión del ADN está en el medio de la secuencia de reconocimiento cerca de la interfaz de las dos subunidades. Las rupturas de la hebra de ADN se compensan con cuatro pares de bases de modo que la escisión del ADN por una meganucleasa genera un par de cuatro pares de bases, salientes de hebra única 3'. Se seleccionan meganucleasas monocatenarias que cortan las secuencias de reconocimiento con salientes complementarias, como en los ejemplos 1 y 2. Las secuencias de reconocimiento de ejemplo para los exones 30 44, 45 y 51 de DMD se enumeran en las tablas 2-7. Para escindir el exón 44, por ejemplo, se puede seleccionar una primera meganucleasa que corta una secuencia de reconocimiento de la tabla 2, que enumera las secuencias de reconocimiento corriente arriba del exón 44. A continuación, se puede seleccionar una segunda meganucleasa que corta una secuencia de reconocimiento de la tabla 3, que enumera Secuencias de Reconocimiento corriente abajo del exón 44. La coexpresión de las dos meganucleasas en la misma célula escindirá así el exón 44. Se seleccionan 35 meganucleasas que cortan el ADN para dejar salientes complementarias de hebra única. Por ejemplo, SEQ ID NO: 19, si se corta mediante una meganucleasa, deja la secuencia saliente: 5'-GTAC-3'. Asimismo, la SEQ ID NO: 42 si se corta con una meganucleasa, deja la secuencia saliente: 5'-GTAC-3'. Por tanto, la coexpresión de una primera meganucleasa que escinde la SEQ ID NO: 19 con una segunda meganucleasa que escinde la SEQ ID NO: 42 escindirá 40 el Exón 44 de DMD del genoma de una célula humana, de modo que se produzcan salientes complementarias que puedan repararse mediante religación directa.

45 Tabla 2. Ejemplos de secuencias de reconocimiento de meganucleasas corriente arriba del exón 44 de DMD

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Salientes |
|-----------------------------|------------|-----------|
| TTCTCTGTGGTGAGAAAATTAA | 2 | GTGA |
| TTCACTATTTGAAATATACAG | 3 | TTGA |
| TATTTGAAATATACAGCACAA | 4 | ATAT |
| TAACTTGTTCATATTACTATG | 5 | TCAT |
| ACTTGTTCATATTACTATGCA | 6 | ATAT |
| CATATTACTATGCAATAGAACAA | 7 | ATGC |

(continuación)

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Salientes |
|-----------------------------|------------|-----------|
| CACTAGAACTTATTACTCCTTT | 8 | TTAT |
| TTTCAGTTGATGAACAGGCAGT | 9 | ATGA |
| AGTTTGATCAAGAATAATAT | 10 | TCAA |
| AAAAATATTTGAAAGGGAATA | 11 | TTGA |
| CCAAATAATTATTACAATGTT | 12 | TTAT |
| ATCTTCTTTAATCAATAAT | 13 | TTAA |
| TTTAATCAATAATATATTCA | 14 | ATAA |
| ACCTTCCATTAAAATCAGCTT | 15 | TTAA |
| TCAGCTTTATATTGAGTATT | 16 | ATAT |
| GCTTTATATTGAGTATT | 17 | TTGA |
| TAAAATGTTGTTGACATGCT | 18 | GTGT |
| ATGTTGTTGACATGCTAGGT | 19 | GTAC |
| GCTAGGTGTTGACATTAATT | 20 | GTAT |
| ATTTGTTACTTGAAACTAACT | 21 | TTGA |
| CTAAACTCTGCAAATGCAGGAA | 22 | GCAA |
| GTGATATCTTGTCACTATAAC | 23 | TTGT |
| AAAAAAATACGCTATATCTCT | 24 | ACGC |
| ATCTGTTTACATAATCCATCT | 25 | ACAT |
| CTGTTTACATAATCCATCTAT | 26 | ATAA |
| CTATTTCTTGATCCATATGC | 27 | TTGA |
| CATATGCTTTACCTGCAGGCG | 28 | TTAC |

Tabla 3. Ejemplos de secuencias de reconocimiento de meganucleasas corriente abajo del exón 44 de DMD

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Salientes |
|-----------------------------|------------|-----------|
| AAATTACTTTGACTGTTGTTG | 29 | TTGA |
| TGACTGTTGTTGTCATCATTAT | 30 | TTGT |
| TTGTTGTCATCATTATATTACT | 31 | TCAT |
| TTGT CAT CAT TATAT TACTAGA | 32 | TTAT |
| ATCATTATATTACTAGAAAGAA | 33 | TTAC |
| AAAATTATCATAATGATAATAT | 34 | ATAA |
| ATGGACTTTTGTCAGGATG | 35 | TTGT |
| GGACTTTTGTCAGGATGAG | 36 | GTGT |
| GGAGCTGGTTATCTGATAAAC | 37 | TTAT |
| ATTGAATCTGTGACAGAGGGAA | 38 | GTGA |
| AGGGAAAGCATCGAACAGCAAG | 39 | TCGT |

(continuación)

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Salientes |
|-----------------------------|------------|-----------|
| GGGCAGTGTATTGGCTTT | 40 | GTAT |
| TATATTCTATTGACAAAATGCC | 41 | TTGA |
| TAATTGTTGGTACTTATTGACA | 42 | GTAC |
| TGTTGGTACTTATTGACATTTT | 43 | TTAT |
| TTTATGGTTATGTTAATAGG | 44 | TTAT |

Tabla 4. Ejemplo de secuencias de reconocimiento de meganucleasas corriente arriba del exón 45 de DMD

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Saliente |
|-----------------------------|------------|----------|
| AGTTTTTTTTAATACTGTGAC | 45 | TTAA |
| TTAATACTGTGACTAACCTAT | 46 | GTGA |
| TTTCACCTCTCGTATCCACGAT | 47 | TCGT |
| TCACCTCTCGTATCCACGATCA | 48 | GTAT |
| CTCGTATCCACGATCACTAAGA | 49 | ACGA |
| CCAAATACTTGTTCATGTTA | 50 | TTGT |
| GGAACATCCTGTGGGGACAAG | 51 | TTGT |
| AATTGCTCTGAAAAGGTTTC | 52 | TTGA |
| CTAATTGATTGTAGGACATTA | 53 | TTGT |
| TTCCCTGACACATAAAAGGTGT | 54 | ACAT |
| CCCTGACACATAAAAGGTGTCT | 55 | ATAA |
| CTTCTGTCTTGTATCCTTGG | 56 | TTGT |
| ATCCTTGGATATGGCATGTC | 57 | ATAT |
| TGGATATGGCATGTCAGTTTC | 58 | GCAT |
| GATATGGCATGTCAGTTTCAT | 59 | ATGT |
| GAAATTTCACATGGAGCTTT | 60 | ACAT |
| TTTCTTCTTGCCAGTACAAC | 61 | TTGC |
| TCTTGCCAGTACAACGTGATG | 62 | GTAC |
| TTTGGTATCTTACAGGAACCTCC | 63 | TTAC |

Tabla 5. Ejemplo de secuencias de reconocimiento de meganucleasas corriente abajo del exón 45 de DMD

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Saliente |
|-----------------------------|------------|----------|
| AAGAATATTCATGAGAGATTA | 64 | TCAT |
| GAATATTCATGAGAGATTATA | 65 | ATGA |
| TGAGAGATTATAAGCAGGGTGA | 66 | ATAA |
| AAGGCACTAACATTAAGAACCC | 67 | ACAT |
| TCAACAGCAGTAAAGAAATTT | 68 | GTAA |

(continuación)

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Saliente |
|-----------------------------|------------|----------|
| TTCTTTTTCATATACTAAAA | 69 | TCAT |
| CTAAAATATATACTTGTGGCTA | 70 | ATAC |
| TGAATATCTTCAATATATTTA | 71 | TCAA |
| CAATTATAATGATTGTTTGT | 72 | ATGA |
| AT GATT GTTT GTAGGAAAGAC | 73 | TTGT |
| TCATATTTGTACAAAATAAAC | 74 | GTAC |

Tabla 6. Ejemplos de secuencias de reconocimiento de meganucleasas corriente arriba del exón 51 de DMD

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Saliente |
|-----------------------------|------------|----------|
| ATACGTGTATTGCTTGTACTAC | 75 | TTGC |
| GTATTGCTTGTACTACTCACTG | 76 | GTAC |
| ACTGAATCTACACAACTGCCCT | 77 | ACAC |
| TGAATCTACACAACTGCCCTTA | 78 | ACAA |
| CAACTGCCCTTATGACATTAC | 79 | TTAT |
| GGTAAATACATGAAAAATGCTT | 80 | ATGA |
| TTGCCTTGCTTACTGCTTATTG | 81 | TTAC |
| GCTTACTGCTTATTGCTAGTAC | 82 | TTAT |
| TAGTACTGAACAAATGTTAGAA | 83 | ACAA |
| ACTGAACAAATGTTAGAACTGA | 84 | ATGT |
| AAGATTTATTTAATGACTTGA | 85 | TTAA |
| CAGTATTCATGTCTAAATAGA | 86 | ATGT |
| GGTTTTCTTCACTGCTGGCCA | 87 | TCAC |
| CAATCTGAAATAAAAAGAAAAA | 88 | ATAA |
| CTGCTCCAGTATAAAATACAG | 89 | GTAT |
| AAGAACGTTCATGGCTTGA | 90 | TCAT |
| ACTTCCTATTCAAGGGATTNTT | 91 | TCAA |
| TGTTTTCTTGAATAAAAAAAA | 92 | TTGA |
| TTTCTTGAATAAAAAAAAAT | 93 | ATAA |
| TTGTTTCTTACCACTTCCAC | 94 | TTAC |
| ACAATGTATATGATTGTTACTG | 95 | ATGA |
| TGTATATGATTGTTACTGAGAA | 96 | TTGT |
| CTTGTCCAGGCATGAGAATGAG | 97 | GCAT |
| TGTCCAGGCATGAGAATGAGCA | 98 | ATGA |
| AATCGTTTTAAAAAATTGTT | 99 | TTAA |
| TTCTACCATGTATTGCTAAACA | 100 | GTAT |

(continuación)

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Saliente |
|-----------------------------|------------|----------|
| TACCATGTATTGCTAACAAAG | 101 | TTGC |
| TATAATGTCATGAATAAGAGTT | 102 | ATGA |
| AT GT CAT GAATAAGAGTTT GGC | 103 | ATAA |
| TTTCCTTTGCAAAACCCA | 104 | TTGC |
| TTCCCTTTGCAAAACCCA | 105 | GCAA |

Tabla 7. Ejemplo de secuencias de reconocimiento de meganucleasas corriente abajo del exón 51 de DMD

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Saliente |
|-----------------------------|------------|----------|
| AGTTCTTAGGCAACTGTTCTC | 106 | GCAA |
| TCTCTCTAGCAACACATTAC | 107 | GCAA |
| TAAGTATAATCAAGGATATAAA | 108 | TCAA |
| AGTAGCCATACATTAAAAAGGA | 109 | ACAT |
| AGGAAATATACAAAAAAA | 110 | ACAA |
| AGAACCTTACAAGAATAGTTG | 111 | ACAA |
| CAAGAATAGTTGTCAGTTAA | 112 | TTGT |
| ATCTATTTATACCAAATAAGT | 113 | ATAC |
| TTATACCAAATAAGTCACTCAA | 114 | ATAA |
| TTTGTGCGACTACGCAGCC | 115 | GCAC |
| TAAGGATAATTGAAAGAGAGCT | 116 | TTGA |
| AGAAAAGTAACAAACATAAGA | 117 | ACAA |
| TTAAAGTT GGCAATTAT GCAAT | 118 | GCAT |
| AGTTGGCATTATGCAATGCCA | 119 | TTAT |
| AACATGTTTAATACAAATAG | 120 | TTAA |
| TACATTGATGAAATATGGTTT | 121 | GTAA |
| ATATCTTTATATTGTGAATG | 122 | ATAT |
| CTTTTATATTGTGAATGATTA | 123 | TTGT |
| TGTGAATGATTAAGAAAAATAA | 124 | TTAA |
| AATTGTTATACATTAAAGTTT | 125 | ACAT |
| AAAGTTTTCACTTGTAACAG | 126 | TCAC |
| TAACAGCTTCAAGCCTTCTA | 127 | TCAA |
| GGTATTTAGGTATTAAAGTACT | 128 | GTAT |
| TACTACCTTGTAAAAACAAG | 129 | TTGA |
| GGAATTCTTGAAATAAAC | 130 | TTGT |
| AACCTGCATTAAAGGCCTTGA | 131 | TTAA |
| TGAGCTTGAATACAGAAGACCT | 132 | ATAC |

(continuación)

| Secuencia de reconocimiento | SEQ ID NO: | Saliente |
|-----------------------------|------------|----------|
| TGATTGTGGTCAAGCCATCTCT | 133 | TCAA |
| CTATTCTGAGTACAGAGCATACTAC | 134 | GTAC |

2.3 Procedimientos para administrar y expresar nucleasas

5 El tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne usando la invención requiere que un par de nucleasas se expresen en una célula muscular. Las nucleasas se pueden administrar como proteína purificada o como ARN o ADN que codifica las nucleasas. En una realización, las proteínas de nucleasa o ARNm o vector que codifica las nucleasas se suministran a las células musculares mediante inyección intramuscular (Maltzahn, et al. (2012) Proc Natl Acad Sci U.S. A. 109: 20614-9) o inyección hidrodinámica (Taniyama et al. al. (2012) Curr Top Med Chem. 12: 1630-7; Hegge, et al. (2010) Hum Gene Ther. 21: 829-42). Para facilitar la absorción celular, las proteínas o los ácidos nucleicos se 10 pueden acoplar a un péptido que penetra en las células para facilitar la absorción por las células musculares. Ejemplos de péptidos de penetración celular conocidos en la técnica incluyen poli-arginina (Jearawiriyapaisarn, et al. (2008) Mol Ther. 16: 1624-9), péptido TAT del virus del VIH (Hudecz et al. (2005), Med. Res. Rev. 25: 679-736), MPG (Simeoni, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31: 2717-2724), Pep-1 (Deshayes et al. (2004) Biochemistry 43: 7698-7706, y HSV-1 15 VP-22 (Deshayes et al. (2005) Cell Mol Life Sci. 62: 1839-49. Alternativamente, la penetración celular se puede facilitar mediante la encapsulación en liposomas (véase, por ejemplo, Lipofectamine™, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA) La formulación de liposomas se puede usar para facilitar la fusión de la bicapa lipídica con una célula diana, permitiendo así que el contenido del liposoma o las proteínas asociadas con su superficie ingresen a la célula.

20 En algunas realizaciones, los genes que codifican un par de nucleasas se administran usando un vector viral. Dichos vectores son conocidos en la técnica e incluyen vectores lentivirales, vectores adenovirales y vectores de virus adenoasociado (AAV) (revisado en Vannucci, et al. (2013) New Microbiol. 36: 1-22). En algunas realizaciones, los vectores virales se inyectan directamente en el tejido muscular. En realizaciones alternativas, los vectores virales se administran sistémicamente. El Ejemplo 3 describe una realización preferida en la que se inyecta al músculo un virus 25 AAV recombinante que codifica un par de meganucleasas monocatenarias. Se sabe en la técnica que diferentes vectores de AAV tienden a localizarse en diferentes tejidos. Los serotipos de AAV musculares-trópicos incluyen AAV1, AAV9 y AAV2,5 (Bowles, et al. (2012) Mol Ther. 20: 443-55). Por tanto, estos serotipos se prefieren para el suministro de nucleasas al tejido muscular.

30 Si los genes de nucleasa se administran en forma de ADN (por ejemplo, plásmido) y/o mediante un vector viral (por ejemplo, AAV), deben estar operativamente unidos a un promotor. En algunas realizaciones, este puede ser un promotor viral tal como promotores endógenos del vector viral (por ejemplo, el LTR de un vector lentiviral) o los promotores tempranos del virus del citomegalovirus o SV40 bien conocidos. En una realización preferida, los genes 35 de nucleasa están operativamente unidos a un promotor que dirige la expresión génica preferentemente en células musculares. Ejemplos de promotores específicos de músculo incluyen C5-12 (Liu, et al. (2004) Hum Gene Ther. 15: 783-92), el promotor de creatina quinasa específico de músculo (MCK) (Yuasa, et al. (2002) Gene Ther. 9: 1576-88), o el promotor de músculo liso 22 (SM22) (Haase, et al. (2013) BMC Biotechnol. 13: 49-54). En algunas realizaciones, los genes de nucleasa están bajo el control de dos promotores separados. En realizaciones alternativas, los genes están bajo el control de un solo promotor y están separados por un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) o una secuencia de péptidos 2A (Szymczak and Vignali (2005) Expert Opin Biol Ther. 5: 627-38).

40 Se prevé que un único tratamiento eliminará permanentemente los exones de un porcentaje de las células del paciente. En realizaciones preferidas, estas células serán mioblastos u otras células precursoras musculares que son capaces de replicarse y dar lugar a fibras musculares completas que expresan distrofina funcional (o semifuncional). Sin embargo, si la frecuencia de eliminación del exón es baja, puede ser necesario realizar múltiples tratamientos en cada paciente, como múltiples rondas de inyecciones intramusculares.

Ejemplos

Esta invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

45 Ejemplo 1

Eliminación del exón 44 de DMD mediante un par de meganucleasas monocatenarias modificadas genéticamente

1. Meganucleasas que reconocen SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 42

50 Se produjo una meganucleasa modificada genéticamente (SEQ ID NO: 135) que reconoce y escinde SEQ ID NO: 19. Esta meganucleasa se denomina "DYS-1/2". Se produjo una segunda meganucleasa modificada genéticamente (SEQ ID NO: 136) que reconoce y escinde SEQ ID NO: 42. Esta meganucleasa se denomina "DYS-3/4" (Figura 3A). Cada meganucleasa comprende una señal de localización de nucleasa N-terminal derivada de SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa.

2. Eliminación del exón 44 de DMD en células HEK-293

Se cotransfectaron células de riñón embrionario humano (HEK-293) con ARNm que codifica DYS-1/2 y DYS-3/4. El ARNm se preparó produciendo primero una plantilla de PCR para una reacción de transcripción in vitro (SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 140. Cada producto de PCR incluía un promotor T7 y 609 pb de secuencia de vector corriente abajo del gen de la meganucleasa. El producto de PCR se purificó en gel para asegurar una única plantilla. Se generó ARN protegido (m7G) usando el kit RiboMAX T7 (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se incluyó el análogo del protector Ribo m7G (Promega) en la reacción y 0,5 ug de la meganucleasa purificada. El producto de PCR sirvió como plantilla de ADN. El ARN protegido se purificó usando el Sistema de aislamiento de ARN total SV (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

- 5 Se nucleofectaron $1,5 \times 10^6$ células HEK-293 con $1,5 \times 10^{12}$ copias de ARNm de DYS-1/2 y $1,5 \times 10^{12}$ copias de ARNm de DYS-3/4 (2×10^6 copias/célula) usando un dispositivo Amaxa Nucleofector II (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, se aisló el ADN genómico de las células usando un kit FlexiGene (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, el ADN genómico se sometió a PCR utilizando cebadores que flanqueaban los sitios de corte DYS-1/2 y DYS-3/4 (SEQ ID NO: 141 y SEQ ID NO: 142). Cuando los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa, fue evidente que las células que coexpresaban DYS-1/2 y DYS-3/4 produjeron dos productos de PCR con longitudes aparentes de 1079 pares de bases y 233 pares de bases, mientras que el ADN genómico de las células HEK-293 no transfectadas produjo solo el producto más grande (Figura 3B). El producto más grande es consistente con el tamaño esperado de un fragmento de PCR de células con DMD Exon 44 intacto. El producto más pequeño es consistente con el tamaño esperado de un fragmento de PCR de células en las que el Exon 44 ha sido escindido del gen DMD.

10 El producto de PCR más pequeño se aisló del gel y se clonó en un plásmido bacteriano (pUC-19) para el análisis de secuencia. Se secuenciaron tres clones de plásmido, y se encontró que todos tenían el exón 44 eliminado (Figura 3C). Sorprendentemente, dos de los tres plásmidos portaban productos de PCR de células en las que la eliminación consistía precisamente en la región que interviene en las rupturas esperadas del ADN inducidas por DYS-1/2 y DYS-15 3/4. Parece que las dos meganucleasas escindieron sus sitios de reconocimiento previstos, dejando salientes de 5'-20 GTAC-3' compatibles, se perdió el fragmento intermedio que comprendía el Exón 44 y, a continuación, se volvieron a ligar los dos extremos del cromosoma. El tercer clon de plásmido llevaba un producto de PCR de una célula en la que se escindió la región que interviene en los dos sitios de escisión junto con 10 bases adicionales.

3. Conclusiones

- 30 Se ha demostrado que es posible utilizar un par de meganucleasas monocatenarias modificadas genéticamente para escindir un fragmento del genoma humano en una línea celular cultivada. El proceso de eliminación y reparación de ADN parece haber procedido a través de un mecanismo que involucra los salientes 3' producidos por las nucleasas, lo que sugiere que el proceso es más eficiente cuando los salientes son complementarios y capaces de aparearse entre sí.

35 Ejemplo 2

Eliminación del exón 45 de DMD mediante un par de meganucleasas monocatenarias modificadas genéticamente

1. Meganucleasas que reconocen SEQ ID NO: 62 y SEQ ID NO: 74

Se produjo una meganucleasa modificada genéticamente (SEQ ID NO: 137) que reconoce y escinde SEQ ID NO: 62. Esta meganucleasa se denomina "DYS-5/6". Se produjo una segunda meganucleasa modificada genéticamente (SEQ ID NO: 138) que reconoce y escinde SEQ ID NO: 74. Esta meganucleasa se denomina "DYS-7/8" (Figura 4A). Cada meganucleasa comprende una señal de localización de nucleasa N-terminal derivada de SV40, una primera subunidad de meganucleasa, una secuencia enlazadora y una segunda subunidad de meganucleasa.

2. Eliminación del exón 45 de DMD en células HEK-293

45 Se cotransfectaron células de riñón embrionario humano (HEK-293) con ARNm que codifica DYS-5/6 y DYS-7/8. El ARNm se preparó produciendo primero una plantilla de PCR para una reacción de transcripción in vitro (SEQ ID NO: 143(20) y SEQ ID NO: 144(21). Cada producto de PCR incluía un promotor T7 y 609 pb de secuencia de vector corriente abajo del gen de la meganucleasa. El producto de la PCR se purificó en gel para asegurar una única plantilla. Se generó ARN protegido (m7G) usando el kit RiboMAX T7 (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y 0,5 ug del producto de PCR de meganucleasa purificado sirvió como molde de ADN. El ARN protegido se purificó usando el SV Total RNA Isolation System (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

50 Se nucleofectaron $1,5 \times 10^6$ células HEK-293 con $1,5 \times 10^{12}$ copias de ARNm de DYS-5/6 y $1,5 \times 10^{12}$ copias de ARNm de DYS-7/8 (2×10^6 copias/célula) usando un dispositivo Amaxa Nucleofector II (Lonza) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 48 horas después de la transfección, se aisló el ADN genómico de las células usando un kit FlexiGene (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, el ADN genómico se sometió a PCR utilizando cebadores que flanqueaban los sitios de corte DYS-5/6 y DYS-7/8 (SEQ ID NO: 145 y SEQ ID NO: 146). Cuando los productos de PCR se resolvieron mediante electroforesis en gel de agarosa, fue evidente que las

células que coexpresaban DYS-5/6 y DYS-7/8 produjeron dos productos de PCR con longitudes aparentes de 1384 pares de bases y 161 pares de bases, mientras que el ADN genómico de HEK-293 no transfectado las células produjeron solo el producto más grande (Figura 4B). El producto más grande es consistente con el tamaño esperado de un fragmento de PCR de células con DMD con Exón 45 intacto. El producto más pequeño es consistente con el tamaño esperado de un fragmento de PCR de células en las que el Exón 45 ha sido escindido del gen DMD.

El producto de PCR más pequeño se aisló del gel y se clonó en un plásmido bacteriano (pUC-19) para el análisis de la secuencia. Se secuenciaron 16 clones de plásmido, y se encontró que todos tenían el exón 45 eliminado (Figura 4C). Sorprendentemente, 14 de los 16 plásmidos portaban productos de PCR de células en las que la eliminación consistía precisamente en la región que interviene en las rupturas esperadas del ADN inducidas por DYS-5/6 y DYS-7/8. Parece que las dos meganucleasas escindieron sus sitios de reconocimiento previstos, dejando salientes de 5'-GTAC-3' compatibles, se perdió el fragmento intermedio que comprendía el Exón 45 y, a continuación, se volvieron a ligar los dos extremos del cromosoma. Los dos clones de plásmido restantes llevaron el producto de la PCR de las células en las que se cortó la región que interviene en los dos sitios de escisión junto con 36 bases adicionales.

3. Conclusiones

Se ha demostrado que es posible utilizar un par de meganucleasas monocatenarias modificadas genéticamente para escindir un fragmento del genoma humano en una línea celular cultivada. El proceso de eliminación y reparación de ADN parece haber procedido a través de un mecanismo que involucra los salientes 3' producidos por las nucleasas, lo que sugiere que el proceso es más eficiente cuando los salientes son complementarios y capaces de aparearse entre sí.

20 Ejemplo 3

Eliminación del exón 23 de DMD en un ratón utilizando meganucleasas administradas por AAV

1. Desarrollo de nucleasas para eliminar el exón 23 de DMD de ratón

El modelo de ratón estándar de DMD es el ratón mdx, que tiene una mutación puntual en el exón 23 que introduce un codón de parada prematuro (Sicinski et al. (1989) *Science*. 244: 1578-80). En el ratón, el Exón 23 de DMD tiene 213 pares de bases, equivalentes a 71 aminoácidos. Por lo tanto, se considera que debería ser posible eliminar el Exón 23 en su totalidad y, por lo tanto, eliminar el codón de parada mientras se mantiene el marco de lectura del gen DMD. Con este fin, desarrollamos un par de meganucleasas monocatenarias denominadas "MDX-1/2" (SEQ ID NO: 147) y "MDX-13/14" (SEQ ID NO: 148). El primero reconoce una secuencia de ADN corriente arriba del Exón 23 de DMD de ratón (SEQ ID NO: 149) mientras que el último reconoce una secuencia de ADN corriente abajo del Exón 23 de DMD de ratón (SEQ ID NO: 150). Las nucleasas se probaron, inicialmente, usando un ensayo indicador llamado "iGFP" en células CHO como se muestra en la Figura 5. Se encontró que ambas nucleasas cortaban eficientemente sus sitios de ADN deseados usando este ensayo.

2. Eliminación del exón 23 de DMD de ratón en células de mioblastos de ratón

Se cotransfectó una línea celular de mioblastos de ratón (C2C12) con ARNm transcrita in vitro que codifica las nucleasas MDX-1/2 y MDX-13/14. El ARNm se produjo usando el kit RiboMAX T7 de Promega. Las células 1e6 C2C12 se sometieron a nucleofección con un total de 2e6 copias/célula de ARNm que codifica cada par de enzimas MDX (1e6 copias de cada ARNm) utilizando un dispositivo Amaxa 2b y el programa B-032. Después de 96 horas, las células se clonaron mediante dilución limitante en placas de 96 pocillos. Después de aproximadamente 2 semanas de crecimiento, se recolectaron las células y se aisló el ADN genómico usando un kit FlexiGene de Qiagen. A continuación, se generó un producto de PCR para cada clon usando un cebador directo en DMD Intrón 22 (SEQ ID NO: 151) y un cebador reverso en Intrón 23 (SEQ ID NO: 152). A continuación, se clonaron y secuenciaron 60 de los productos de PCR. 20 de las secuencias tenían eliminaciones consistentes con la escisión inducida por meganucleasa del gen DMD seguida de reparación mutagénica del ADN (Figura 6, SEQ ID NO: 153-172). A 11 de las secuencias les faltaba al menos una parte de los sitios de reconocimiento MDX-1/2 y MDX-13/14, así como el Exón 23 (SEQ ID NO: 153-163). Estas secuencias probablemente se derivaron de células en las que ambas nucleasas cortaron sus sitios previstos y se eliminó la secuencia intermedia. A 4 de las secuencias les faltaba el exón 23 pero tenían una secuencia de reconocimiento MDX-1/2 intacta (SEQ ID NO: 164-167). Estos parecen deberse a la escisión del ADN por MDX-13/14 solo seguido de la eliminación de una gran cantidad de secuencia. Cinco de las secuencias tenían un sitio de reconocimiento MDX-1/2 intacto y todo o una parte del Exón 23, pero faltaban todo o una parte del sitio de reconocimiento MDX-13/14 (SEQ ID NO: 168-172). Estas secuencias parecen deberse a la escisión del ADN por MDX-13/14 solo seguido de la eliminación de una cantidad menor de secuencia insuficiente para eliminar todo el Exón 23. En marcado contraste con los experimentos de los Ejemplos 1 y 2, no obtuvimos una secuencia de ADN consistente después de la eliminación del Exón 23 de DMD en las células de ratón. Esto probablemente se deba a que las dos meganucleasas MDX no generan rupturas de ADN con salientes 3' compatibles. MDX-1/2 genera un saliente con la secuencia 5'-GTGA-3' y MDX-13/14 genera un saliente con la secuencia 5'-ACAC-3'. Por tanto, concluimos que los resultados de secuencia consistente obtenidos en los Ejemplos 1 y 2 se deben a la compatibilidad de los salientes 3' generados por el par de meganucleasas.

3. Generación de vectores AAV recombinantes para el suministro de un par de nucleasas modificadas genéticamente.

Para producir vectores AAV para la administración simultánea de genes MDX-1/2 y MDX-13/14, primero se produjo un plásmido de "empaquetamiento" llamado "pAAV-MDX" (Figura 7, SEQ ID NO. 173) que comprende un par de secuencias de repetición terminal invertida (ITR) de AAV2, así como las secuencias de codificación de genes para las meganucleasas MDX-1/2 y MDX-13/14, cada una bajo el control de un promotor temprano de CMV. Este vector se utilizó para producir virus AAV2 recombinante mediante cotransfección de células HEK-293 con un plásmido Ad auxiliar de acuerdo con el procedimiento de Xiao, et al. (Xiao, et al. (1998) J. Virology 72: 2224-2232). A continuación, se aisló el virus mediante centrifugación en gradiente de cloruro de cesio como describen Grieger and Samulski (Grieger and Samulski (2012) Methods Enzymol. 507: 229-254). Para confirmar que las partículas de virus resultantes eran infecciosas y capaces de expresar ambas meganucleasas modificadas genéticamente, se añadieron a células iGFP CHO cultivadas que llevaban cassetes informadores para MDX-1/2 o MDX-13/14 (véase Figura 5A). La adición de partículas de virus recombinantes a la línea CHO que lleva un casete indicador para MDX-1/2 dio como resultado la expresión del gen GFP en el 7.1% de las células. La adición de virus a la línea CHO que lleva un indicador de MDX-13/14 dio como resultado la expresión del gen GFP en el 10,2% de las células. Por tanto, concluimos que el virus fue capaz de transducir células CHO y que las células transducidas expresaron ambas nucleasas.

15 **4. Eliminación del exón 23 de DMD en músculo de ratón después de la administración de AAV de un par de genes de meganucleasa.**

Se produjeron partículas de virus AAV1 recombinantes que portaban los genes MDX-1/2 y MDX-13/14 como se describió anteriormente. Se inyectaron virus a tres músculos TA de las patas traseras de un par de ratones mdx como se describe en Xiao et al. (Xiao et al. (1998) J. Virology 72: 2224-2232). Un músculo de un ratón no se inyectó como control negativo. Los músculos de los dos ratones se recogieron a los 4 o 7 días después de la inyección y se aisló el ADN genómico del tejido muscular. La región genómica que rodea al Exón 23 de DMD se amplificó mediante PCR usando un primer par de cebadores (SEQ ID NO: 151 y SEQ ID NO: 152). Esta reacción se usó luego para moldear una segunda reacción de PCR usando un par de cebadores "anidados" (SEQ ID NO: 174 y SEQ ID NO: 175) para eliminar productos de PCR no específicos. Luego, los productos de PCR se visualizaron en un gel de agarosa y se encontró que el ADN genómico de los tres músculos inyectados con AAV1, pero no el músculo de control no inyectado, producía productos de PCR más pequeños que eran consistentes en tamaño con el producto esperado después de la eliminación de DMD Exon 23 por las meganucleasas MDX-1/2 y MDX-13/14. A continuación, se clonaron y secuenciaron los productos de PCR más pequeños. Se obtuvieron tres secuencias únicas, cada una de las cuales comprendía una parte del gen DMD de ratón que incluía parte de Intrón 22 e Intrón 23 pero que carecía del Exon 23 y toda la secuencia que interviene en los sitios de corte para MDX-1/2 y MDX-13/14 meganucleasas (SEQ ID NO: 176-178). Por tanto, se ha demostrado que un par de meganucleasas liberadas por AAV pueden usarse para eliminar una porción del gen DMD in vivo del músculo del ratón.

5. Conclusiones

35 Se ha demostrado que los genes que codifican un par de meganucleasas monocatenarias modificadas genéticamente pueden administrarse a células y organismos utilizando vectores AAV recombinantes y que las meganucleasas así administradas pueden escindir el ADN genómico en la célula y eliminar fragmentos de ADN del genoma. Además, se ha demostrado que un par de rupturas de ADN inducidas por meganucleasa que no generan salientes compatibles no volverán a ligarse para producir un resultado de secuencia definido después de la eliminación de la secuencia intermedia. Por tanto, para aplicaciones terapéuticas en las que es deseable un resultado de secuencia definido, es preferible utilizar un par de nucleasas que generen salientes idénticas.

Listado de secuencias

SEQ ID NO: 1 (I-Crel de tipo silvestre, Genbank Acceso # P05725)

```

1 MNTKYNKEFL LYLGFVDGD GSIIAQIKPN QSYKFKHQLS LAFQVTQKTO RRWFLDKLVD
61 EIVGVYVRDR GSVSDYILSE IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIIW RLPSAKESPD
121 KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTTSETVRA VLDSLSEKKK SSP

```

SEQ ID NO: 135 (DYS-1/2)

```

1 MAPKKRKVH MNTKYNKEFL LYLGFVDGD GSTIYAWISPS QTCKFKHRLM LRFIVSQKTQ
61 RRWFLDKLVD EIVGVYVQDC GSVSEYRLSE IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIIE
121 QLPSAKESPD KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTTSETVRA VLDSLPGSVG GLSPSQASSA
181 ASSASSSPGS GISEALRAGA GSGTGYNKEF LLYLAGFVDG DGSIYACILP TQRQKFKHGL
241 TLYFRVTQKT QRRWFLDKLV DEIVGVYVLD FGSVSCYSLS QIKPLHNFLT QLQPFLKLKQ
301 QANLVLKII EQLPSAKESP DKLEVCTWV DQIAALNDSK TRKTTSETVR AVLDSLSEKK
361 KSSP

```

SEQ ID NO: 136 (DYS-3/4)

1 MAPKKKRKVH MNTKYNKEFL LYLAFVVDGD GSIFASIRPR QTSKFKHALA LFFVVGQKTQ
 61 RRWFLDKLVD EIGVGYVYDR GSVSVYQLSQ IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIIIE
 121 QLPSAKESPD KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTTSETVRA VLDLSPGSVG GLSPSQASSA
 181 ASSASSSPGS GISEALRAGA GSGTGYNKEF LLYLAGFVVG DGSIIACIRP HQAYKFKHQL
 241 CLSFCVYQKT QRRWFLDKLV DEIGVGYVTD AGSVSSYRLS EIKPLHNFLT QLQPFLKLKQ
 301 KQANLVLKII EQLPSAKESP DKFLEVCTWV DQIAALNDSK TRKTTSETVR AVLDSLSEKK
 361 KSSP

SEQ ID NO: 137 (DYS-5/6)

1 MAPKKKRKVH MNTKYNKEFL LYLAFVVDGD GSIFACIOPD QRAKFKHTLR LSFEVGQKTQ
 61 RRWFLDKLVD EIGVGYVNDs GSVSKYRLSQ IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIIIE
 121 QLPSAKESPD KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTTSETVRA VLDLSPGSVG GLSPSQASSA
 181 ASSASSSPGS GISEALRAGA GSGTGYNKEF LLYLAGFVVG DGSIYATIOP TQCAKFKHQL
 241 TLRFSVSQKT QRRWFLDKLV DEIGVGYVCD KGSVSEYMLS EIKPLHNFLT QLQPFLKLKQ
 301 KQANLVLKII EQLPSAKESP DKFLEVCTWV DQIAALNDSK TRKTTSETVR AVLDSLSEKK
 361 KSSP

SEQ ID NO: 138 (DYS-7/8)

1 MAPKKKRKVH MNTKYNKEFL LYLAFVVDGD GSIFYACILPV QRCKFKHGLS LRFMVSQKTQ
 61 RRWFLDKLVD EIGVGYVYDC GSVSEYRLSE IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIIIE
 121 QLPSAKESPD KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTTSETVRA VLDLSPGSVG GLSPSQASSA
 181 ASSASSSPGS GISEALRAGA GSGTGYNKEF LLYLAGFVVG DGSIFASIVP DQRSKFKHGL
 241 ALRFNVVQKT QRRWFLDKLV DEIGVGYVYD QGSVSEYRLS EIKPLHNFLT QLQPFLKLKQ
 301 KQANLVLKII EQLPSAKESP DKFLEVCTWV DQIAALNDSK TRKTTSETVR AVLDSLSEKK
 361 KSSP

SEQ ID NO: 139 (DYS-1/2 Plantilla PCR para ARNm)

1 CACAGGTGTC CACTCCCAGT TCAATTACAG CTCTTAAGGC TAGAGTACTT AATACGACTC
 61 ACTATAGGCT AGCCTCGAGC CGCCACCATG GCACCGAAGA AGAACGCGAA GGTGCATATG
 121 AATACAAAAT ATAATAAAGA GTTCTTACTC TACTTAGCAG GTTTGTAGA CGGTGACGGT
 181 TCCATCTATG CCTGGATCAG TCCTTCGCAA ACGTGTAAAGT TCAAGCACAG GCTGATGCTC
 241 CGGTTCATG TCTCGCAGAA GACACAGCGC CGTTGGTCC TCGACAAGCT GGTGGACGAG
 301 ATCGGTGTGG GTTACGTGCA GGACTGTGGC AGCGTCTCCG AGTACCGGCT GTCCGAGATC
 361 AAGCCTTGC ATAATTTTT AACACAACCA CAACCTTTTC TAAAACAAA ACAAAAACAA
 421 GCAAATTAG TTTAAAAAT TATTGAACAA CTTCCGTCAAG CAAAAGAAC CCGGACAAA
 481 TTCTTAGAAG TTGTACATG GGTGGATCAA ATTGCAAGCTC TGAATGATTC GAAGACCGT
 541 AAAACAACCT CTGAAACCGT TCGTGTGTG CTAGACAGTT TACCAGGATC CGTGGGAGGT
 601 CTATGCCAT CTCAGGCATC CAGCGCCGCA TCCTCGGCTT CCTCAAGCCC GGGTTCAGGG
 661 ATCTCCGAAG CACTCAGAGC TGGAGCAGGT TCCGGCACTG GATACAACAA GGAATTCCGT
 721 CTCTACCTGG CGGGCTTCGT CGACGGGGAC GGCTCCATCT ATGCCTGTAT CCTTCCGACT
 781 CAGCGTCAGA AGTTCAAGCA CGGGCTGACG CTCTATTTC GGGTCACTCA GAAGACACAG
 841 CGCCGTTGGT TCCTCGACAA GCTGGTGGAC GAGATCGGTG TGGGTTACGT GCTGGACTTT
 901 GGCAGCGTCT CCTGTTACTC TCTGTCCCAG ATCAAGCCTC TGCACAACCT CCTGACCCAG
 961 CTCCAGCCCT TCCTGAAGCT CAAGCAGAAG CAGGCCAAC TCGTGCTGAA GATCATCGAG
 1021 CAGCTGCCCT CCGCCAAGGA ATCCCCGGAC AAGTTCCTGG AGGTGTGCAC CTGGGTGGAC
 1081 CAGATCGCCG CTCTGAACGA CTCCAAGACC CGCAAGACCA CTTCCGAAAC CGTCCGCGCC
 1141 GTCTAGACA GTCTCTCCGA GAAGAAGAAG TCGTCCCCCT AAACAGTCTC TCCGAGAAGA
 1201 AGAAGTCGTC CCCCTAGCGG CCGCTTCGAG CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTTG
 1261 GACAAACCAC AACTAGAATG CAGTAAAAAA AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA
 1321 TTGCTTTATT TGTAAACCATT ATAAGCTGCA ATAAACAAGT TAACAACAAAC AATTGCATTC
 1381 ATTTTATGTT TCAGGTTCAAG GGGGAGATGT GGGAGGTTTT TTAAAGCAAG TAAAACCTCT
 1441 ACAAAATGTGG TAAAATCGAT AAGATCTGA TCCGGGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCG
 1501 CACCGATCGC CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGACGC GCCCTGTAGC
 1561 GCGCATTAA GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC
 1621 GCCCTAGCGC CCGCTCCTTT CGCTTTCTTC CCTTCCTTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT
 1681 CCCCCGTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTAGTGC TTTACGGCAC
 1741 CTCGACCCCA AAAAACTTGA TTAGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC G

SEQ ID NO: 140 (DYS-3/4 Plantilla PCR para ARNm)

1 CACAGGTGTC CACTCCAGT TCAATTACAG CTCTTAAGGC TAGAGTACTT AATACGACTC
 61 ACTATAGGCT AGCCTCGAGC CGCCACCATG GCACCGAAGA AGAAGGCCAA GGTGCATATG
 121 AATACAAAAT ATAATAAAGA GTTCTTACTC TACTTAGCAG GGTTTGTAGA CGGTGACGGT
 181 TCCATCTTG CCTCTATCCG GCCTCGGCAA ACGAGTAAGT TCAAGCACGC GCTGGCTCTC
 241 TTTTTCGTGG TCGGGCAGAA GACACAGCGC CGTGGTTCC TCGACAAGCT GGTGGACGAG
 301 ATCGGTGTGG GTTACGTGTA TGACCGTGGC AGCGTCTCCG TGTACAGCT GTCCCAGATC
 361 AAGCCTTGC ATAATTTTT AACACAAC TAACCTTTTC TAAAAC TAAAACAA ACAAAAACAA
 421 GCAAATTAG TTTAAAAAT TATTGAACAA CTTCCGTAG CAAAAGAATC CCCGGACAAA
 481 TTCTTAGAAG TTTGTACATG GGTGGATCAA ATTGCAGCTC TGAATGATTC GAAGACGCGT
 541 AAAACAACCTT CTGAAACCGT TCGTGCTGTG CTAGACAGTT TACCAAGATC CGTGGGAGGT
 601 CTATGCCAT CTCAGGCATC CAGCGCCGCA TCCTCGGCTT CCTCAAGCCC GGGTTCAGGG
 661 ATCTCCGAAG CACTCAGAGC TGGAGCAGGT TCCGGCACTG GATAACAACAA GGAATTCTG
 721 CTCTACTTGG CGGGCTTCGT CGACGGGAC GGCTCCATCA TTGCTGTAT CCGGCCTCAT
 781 CAAGCTTATA AGTTCAAGCA CCAGCTGTG CTCTCTTTCT GTGTCTATCA GAAGACACAG
 841 CGCGCTTGGT TCCTCGACAA GCTGGTGGAC GAGATCGGTG TGGGTTACGT GACGGACGCT
 901 GGCAGCGTCT CCTCTTACCG GCTGTCCGAG ATCAAGCCTC TGCACAACCTT CCTGACCCAG
 961 CTCCAGCCCT TCCTGAAGCT CAAGCAGAAG CAGGCCAAC TCGTGCTGAA GATCATCGAG
 1021 CAGCTGCCCT CCGCCAAGGA ATCCCCGGAC AAGTCCCTGG AGGTGTGCAC CTGGGTGGAC
 1081 CAGATGCCG CTCTGAACGA CTCCAAGACC CGCAAGACCA CTTCCGAAAC CGTCCGCGCC
 1141 GTTCTAGACA GTCTCTCCGA GAAGAAGAAG TCGTCCCCCT AAACAGTCTC TCCGAGAAGA
 1201 AGAAGTCGTC CCCCTAGCGG CCGCTTCGAG CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTTG
 1261 GACAAACCAC AACTAGAATG CAGTAAAAAA AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA
 1321 TTGCTTTATT TGTAACCATT ATAAGCTGCA ATAAACAAGT TAACAACAAC AATTCATTC
 1381 ATTTTATGTT TCAGGTTCAAG GGGGAGATGT GGGAGGTTTT TTAAAGCAAG TAAAACCTCT
 1441 ACAAAATGTGG TAAAATCGAT AAGATCTTGA TCCGGGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCG
 1501 CACCGATCGC CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGACGC GCCCTGTAGC
 1561 GGCAGCTAA GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGGCAGC
 1621 GCCCTAGCGC CCGCTCCTT CGCTTCTTC CCTTCCTTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT
 1681 CCCCGTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC
 1741 CTCGACCCCA AAAAAGTGA TTAGGGTGAT GGTTCACGTA GTGGGCCATC G

SEQ ID NO: 141 (cebador de PCR directo del exón 44)

1 GAAAGAAAAT GCCAATAGTC CAAAATAGTT G

SEQ ID NO: 142 (cebador de PCR reverso del exón 44)

5 1 CATATTCAAA GGACACCACA AGTTG

SEQ ID NO: 143 (DYS-5/6 Plantilla PCR para ARNm)

1 CACAGGTGTC CACTCCAGT TCAATTACAG CTCTTAAGGC TAGAGTACTT AATACGACTC
 61 ACTATAGGCT AGCCTCGAGC CGCCACCATG GCACCGAAGA AGAAGCGCAA GGTGCATATG
 121 AATACAAAAT ATAATAAAGA GTTCTTACTC TACTTAGCAG GGTTTGTAGA CGGTGACGGT
 181 TCCATCTTG CCTGTATCCA GCCTGATCAA AGGGCGAAGT TCAAGCACAC GCTGCGGCTC
 241 TCTTCGAGG TCGGGCAGAA GACACAGCGC CGTTGGTTCC TCGACAAGCT GGTGGACGAG
 301 ATCGGTGTGG GTTACGTGAA TGACTCTGGC AGCGTCTCCA AGTACAGGCT GTCCCAGATC
 361 AAGCCTTGC ATAATTTTT AACACAACTA CAACCTTTT TAAAACTAAA ACAAAAACAA
 421 GCAAATTAG TTTTAAAAAT TATTGAACAA CTTCCGTCAG CAAAAGAATC CCCGGACAAA
 481 TTCTTAGAAG TTTGTACATG GGTGGATCAA ATTGCAGCTC TGAATGATTG GAAGACGCGT
 541 AAAACAACCT CTGAAACCGT TCGTGTGTG CTAGACAGTT TACCAGGATC CGTGGGAGGT
 601 CTATGCCAT CTCAGGCATC CAGCGCCGCA TCCTCGGCTT CCTCAAGGCC GGGTTCAGGG
 661 ATCTCCGAAG CACTCAGAGC TGGAGCAGGT TCCGGCACTG GATACAACAA GGAATTCCCTG
 721 CTCTACCTGG CGGGCTTCGT CGACGGGGAC GGCTCCATCT ATGCCACTAT CCAGCCTACT
 781 CAATGTGCGA AGTTCAAGCA CCAGCTGACT CTCCGTTCT CGGTCTCTCA GAAGACACAG
 841 CGCCGTTGGT TCCTCGACAA GCTGGTGGAC GAGATCGGTG TGGGTTACGT GTGTGACAAG
 901 GGCAGCGTCT CCGAGTACAT GCTGTCCGAG ATCAAGCCTC TGCACAACATT CCTGACCCAG
 961 CTCCAGCCCT TCCTGAAGCT CAAGCAGAAG CAGGCCAAC TCGTGTGAA GATCATCGAG
 1021 CAGCTGCCCT CCGCCAAGGA ATCCCCGGAC AAGTTCTGG AGGTGTGCAC CTGGGTGGAC
 1081 CAGATCGCCG CTCTGAACGA CTCCAAGACC CGCAAGACCA CTTCCGAAAC CGTCCGCGCC
 1141 GTTCTAGACA GTCTCTCCGA GAAGAAGAAG TCGTCCCCCT AAACAGTCTC TCCGAGAAGA
 1201 AGAAGTCGTC CCCCTAGCGG CCGCTTCGAG CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTG
 1261 GACAAACCCAC AACTAGAATG CAGTGAAAAA AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA
 1321 TTGCTTTATT TGTAACCATT ATAAGCTGCA ATAAACAAGT TAACAACAAAC AATTGCATTC
 1381 ATTTTATGTT TCAGGTTCAAG GGGGAGATGT GGGAGGTTTT TAAAGCAAG TAAAACCTCT
 1441 ACAAAATGTGG TAAAATCGAT AAGATCTTGA TCCGGGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG
 1501 CACCGATCGC CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGACGC GCCCTGTAGC
 1561 GGCCTATTAA GCGCGGGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC
 1621 GCCCTAGCGC CCGCTCCCTT CGCTTCTTC CCTTCCTTTC TCGCACGTT CGCCGGTTT
 1681 CCCCGTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTAGTGC TTTACGGCAC
 1741 CTCGACCCCA AAAAACTTGA TTAGGGTGAT GGTCACGTA GTGGGCCATC G

SEQ ID NO: 144 (DYS-7/8 Plantilla PCR para ARNm)

1 CACAGGTGTC CACTCCAGT TCAATTACAG CTCTTAAGGC TAGAGTACTT AATACGACTC
 61 ACTATAGGCT AGCCTCGAGC CGCCACCATG GCACCGAAGA AGAAGCGCAA GGTGCATATG
 121 AATACAAAAT ATAATAAAGA GTTCTTACTC TACTTAGCAG GGTTTGTAGA CGGTGACGGT
 181 TCCATCTATG CCTGTATCTT GCCGGTGCAG CGTTGTAAGT TCAAGCACGG GCTGTCTCTC
 241 CGATTATGG TCAGTCAGAA GACACAGCGC CGTTGGTTCC TCGACAAGCT GGTGGACGAG
 301 ATCGGTGTGG GTTACGTGTA TGACTGTGGC AGCGTCTCCG AGTACAGGCT GTCCGAGATC
 361 AAGCCTTGC ATAATTTTT AACACAACTA CAACCTTTT TAAAACTAAA ACAAAAACAA
 421 GCAAATTAG TTTTAAAAAT TATTGAACAA CTTCCGTCAG CAAAAGAATC CCCGGACAAA
 481 TTCTTAGAAG TTTGTACATG GGTGGATCAA ATTGCAGCTC TGAATGATTG GAAGACGCGT
 541 AAAACAACCT CTGAAACCGT TCGTGTGTG CTAGACAGTT TACCAGGATC CGTGGGAGGT
 601 CTATGCCAT CTCAGGCATC CAGCGCCGCA TCCTCGGCTT CCTCAAGGCC GGGTTCAGGG
 661 ATCTCCGAAG CACTCAGAGC TGGAGCAGGT TCCGGCACTG GATACAACAA GGAATTCCCTG
 721 CTCTACCTGG CGGGCTTCGT CGACGGGGAC GGCTCCATCT TTGCTCTTAT CGTCCGCGGAT
 781 CAGCGTAGTA AGTTCAAGCA CGGTCTGGCT CTCAGGTTCA ATGTCGTTCA GAAGACACAG
 841 CGCCGTTGGT TCCTCGACAA GCTGGTGGAC GAGATCGGTG TGGGTTACGT GTATGACCAG
 901 GGCAGCGTCT CCGAGTACAG GCTGTCCGAG ATCAAGCCTC TGCACAACATT CCTGACCCAG
 961 CTCCAGCCCT TCCTGAAGCT CAAGCAGAAG CAGGCCAAC TCGTGTGAA GATCATCGAG
 1021 CAGCTGCCCT CCGCCAAGGA ATCCCCGGAC AAGTTCTGG AGGTGTGCAC CTGGGTGGAC
 1081 CAGATCGCCG CTCTGAACGA CTCCAAGACC CGCAAGACCA CTTCCGAAAC CGTCCGCGCC
 1141 GTTCTAGACA GTCTCTCCGA GAAGAAGAAG TCGTCCCCCT AAACAGTCTC TCCGAGAAGA
 1201 AGAAGTCGTC CCCCTAGCGG CCGCTTCGAG CAGACATGAT AAGATACATT GATGAGTTG
 1261 GACAAACCCAC AACTAGAATG CAGTGAAAAA AATGCTTTAT TTGTGAAATT TGTGATGCTA
 1321 TTGCTTTATT TGTAACCATT ATAAGCTGCA ATAAACAAGT TAACAACAAAC AATTGCATTC
 1381 ATTTTATGTT TCAGGTTCAAG GGGGAGATGT GGGAGGTTTT TAAAGCAAG TAAAACCTCT
 1441 ACAAAATGTGG TAAAATCGAT AAGATCTTGA TCCGGGCTGG CGTAATAGCG AAGAGGCCCG
 1501 CACCGATCGC CCTTCCCAAC AGTTGCGCAG CCTGAATGGC GAATGGACGC GCCCTGTAGC

1561 GGCGCATTAA GCGCGGCGGG TGTGGTGGTT ACGCGCAGCG TGACCGCTAC ACTTGCCAGC
1621 GCCCTAGCGC CCGCTCCTTT CGCTTCTTC CCTTCCTTC TCGCCACGTT CGCCGGCTTT
1681 CCCCGTCAAG CTCTAAATCG GGGGCTCCCT TTAGGGTTCC GATTTAGTGC TTTACGGCAC
1741 CTCGACCCCCA AAAAACTTGA TTAGGGTGAT GGTCACGTA GTGGGCCATC G

SEQ ID NO: 145 (cebador de PCR directo del exón 45)

1 CTAACCGAGA GGGTGCTTTT TTC

SEQ ID NO: 146 (cebador de PCR reverso del exón 45)

5 1 GTGTTTAGGT CAACTAATGT GTTTATTTG

SEQ ID NO: 147 (MDX-1/2 Meganucleasa)

1 MAPKKKRKVH MNTKYNKEFL LYLAFVVDGD GSIFACIHPS QAYKFKHRLT LHFTVTQKTO
61 RRWFLDKLVD EIGVGYVQDV GSVSQYRLSQ IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIE
121 QLPSAKESPD KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTTSETVRA VLDSLPGSVG GLSPSQASSA
181 ASSASSSPGS GISEALRAGA GSGTGYNKEF LLYLAGFVDG DGSISATIAP AQYGKFHKL
241 GLRFYVSQKT QRRWFLDKLV DEIGVGYVSD QGSVSRYCLS QIKPLHNFLT QLQPFLKLQK
301 KQANLVLKII EQLPSAKESP DKFLEVCTWV DQIAALNDSK TRKTTSETVR AVLDSLSEKK
361 KSSP

SEQ ID NO: 148 (MDX-13/14 Meganucleasa)

1 MAPKKKRKVH MNTKYNKEFL LYLAFVVDGD GSIFACIRPT QSVFKHDLL LCFDVSQKTQ
61 RRWFLDKLVD EIGVGYVYDR GSVSSYRLSE IKPLHNFLTQ LQPFLKLKQK QANLVLKIE
121 QLPSAKESPD KFLEVCTWVD QIAALNDSKT RKTTSETVRA VLDSLPGSVG GLSPSQASSA
181 ASSASSSPGS GISEALRAGA GSGTGYNKEF LLYLAGFVDG DGSIWASIEP RQOSKFKHQL
241 RLGFVSYQKT QRRWFLDKLV DEIGVGYVRD TGSVSCYCLS QIKPLHNFLT QLQPFLKLQK
301 KQANLVLKII EQLPSAKESP DKFLEVCTWV DQIAALNDSK TRKTTSETVR AVLDSLSEKK
361 KSSP

SEQ ID NO: 149 (secuencia de reconocimiento MDX-1/2)1

TTCTGTGATG TGAGGACATA TA

10 SEQ ID NO: 150 (Secuencia de reconocimiento MDX-13/14)

1 ACTAATGAAA CACCACTCCA CA

SEQ ID NO: 151 (cebador directo Intrón 22 de DMD de ratón)

1 GTCTTATCAG TCAAGAGATC ATATTG

SEQ ID NO: 152 (cebador reverso DMD Intrón 23 de ratón)

15 1 GTGTCAGTAA TCTCTATCCC TTTCATG

SEQ ID NO: 153 (Secuencia Mutante de Gen DMD de Ratón)

1 AGAATTAAA TATTAACAAA CTATAACACT ATGATTAAT GCTTGATATT GAGTAGTTAT
61 TTTAATAGCC TAAGTCTGGA AATTAATAC TAGTAAGAGA AACTTCTAGA ATTTAAATAT
121 TAACAAACTA TAACACTATG ATTAAATGCT TGATATTGAG TAGTTATTTT AATAGCCTAA
181 GTCTGGAAAT TAAATACTAG TAAGAGAAC TTCT

SEQ ID NO: 154 (Secuencia Mutante de Gen DMD de Ratón)

1 TTTAATAGCC TAAGTCTGGA AATACTCCAC AGGTGATTTC AGCCACTTTA TGAAC TGCTG
61 GAAGCAAAAA TGAGATCTTT

SEQ ID NO: 155 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 TTAGTTAGAA TTTAAATATT AACAAACTAT AACACTATGA TTAAATGCTT GATATTGAGT
61 AGTTATTTA ATAGCCTAAG TCTGGAAATT AAATACTAGT AAGAGAAACT TCTGTGATGT
121 GACCACTCCA CAGGTGATT CAGCCACTTT ATGAACTGCT GGAAGCAAAA ATGAGATCTT
181 T

SEQ ID NO: 156 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 TATAACACTA TGATTAATG CTTGATATTG AGTAGTTATT TTATGTGTCA TACCTCTTG
61 GATTGTCTGT ATAAATGAAT TGATTTTTT TCACCAACTC CAAGTATACT TAACATTTA
121 ACATAATAAT TTAAATATC CTTATTCCAT TATGTTCATT TTTTAAGTTG TAGATATGAT
181 TTAGCTCACA GCATACATAT ATACACATGT ATTACATATG CATATATTAT ATATATGGCA
241 GACATATGTT TTCACATACCA TATTTCATT TTGAATTATG AATATATGTT TAATTCTGC
301 CATATTCCT TCCCTACATT GACTTCTATT AATTTAGTAT TTCAGTAGTT CTAACACATT
361 AATAATAACC TAGACTCAAT ACAGTAATCT AACAAATTATA TTTGTGCCTG TAATTCTAAG
421 TTAGTTAAAT TCATAGGTTG TGTTTCTCAT AGTTGGCCAT TTGTGAAATA TAATAATATC
481 CGAAAAGAAA GTCAAAAAT GTCATGACTT CATATAGAGT TATTGAAACA GTGCCCTTAC
541 TTTCATTCTG GCCATGCTAG TGACTTGATC ATTCTGTAT TTTACAGCTA AAACACTACC
601 AAAAGTGTCA AATCCATGAT CTACATGTT GACCACTCCA CAGGTGATT CAGCCACTTT
661 ATGAACTGCT GGAAGCAAAA ATGAGATCTT T

SEQ ID NO: 157 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 TTGAGTAGTT ATTTTAATAG CCTAAGTCTG GAAATTAAAT ACTAGTAAGA GAAACTCTG
61 TGATGTGCAC AGGTGATTTC AGCCACTTTA TGAACGTCTG GAAGCAAAA TG

SEQ ID NO: 158 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 GATATTGAGT AGTTATTTA ATAGCCTAAG TCTGGAAATT AAATACTAGT AGATTCAGC
61 CACTTATGA ACTGCTGGAA GCAAAATGA

SEQ ID NO: 159 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 AATACTAGTA AGAGAAACTT CTGTGATGTG AGGACTCCAC AGGTGATTTC AGCCACTTTA
61 TGAACGTCTG GAAGCAAAA TGAGATCTT GCAACATGAA GCAGTTGCTC AGTTCAATTAA
121 ACTGTGTTCA ATATTCAGC CATAACATAC ATTAGAGAAT GATTATATT GTTAAACAT
181 TT

SEQ ID NO: 160 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 AATACTAGTA AGAGAAACTT CTGTGATGTG AGGACATTTC AGCCACTTTA TGAACGTCTG
61 GAAGCAAAA TGAGATCTT GCAACATGAA GCAGTTGCTC AGTTCAATTAA ACTGTGTTCA
121 ATATTCAGC CATAACATAC ATTAGAGAAT GATTATATT GTTAAACAT TT

SEQ ID NO: 161 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 AATACTAGTA AGAGAAAGATT TCAGCCACTT TATGAACTGTC TGGAAGCAAA AATGAGATCT
61 TTGCAACATG AAGCAGTTGC TCAGTTCATT AAACGTGTT CAATATTCA GCCATAACAT
121 ACATTAGAGA ATGATTATAA TTGTTCAAAC ATTT

SEQ ID NO: 162 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 TTTAATAGCC TAAGTCTGGA AATTAAATAC TAGTAAGAGA GTGATTCAG CCACTTTATG
61 AACTGCTGGA AGCAAAATG A

SEQ ID NO: 163 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

```

1 TTAGTTAGAA TTTAAATATT AACAAACTAT AACACTATGA TTAAATGCTT GATATTGAGT
61 AGTTATTTA ATAGCCTAAG TCTGGAAATT AAATACTAGT TCAGCCACTT TATGAACTGC
121 TGGAAGCAAA AATGAGATCT CATTAAACTG TGTTCAATAT TTCAGCCATA ACATACATTA
181 GAGAATGATT TATATTGTTG AAACATTTGG TGCTCTATT TTGCATGACG TGGGA

```

SEQ ID NO: 164 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

```

1 TTAGTTAGAA TTTAAATATT AACAAACTAT AACACTATGA TTAAATGCTT GATATTGAGT
61 AGTTATTTA ATAGCCTAAG TCTGGAAATT AAATACTAGT AAGAGAAACT TCTGTGATGT
121 GAGGACATAT AAAGACTAAT TTTTTGTTG ATTCTAAAAA TCCACAGGTG ATTTCAGCCA
181 CTTTATGAAC TGCTGGAAGC AAAATGAGA TCTTGCAAC ATGAAGCAGT TGCTCAGTTC
241 ATTAACACTGT GTTCAATATT TCAGCCATAA CATACTATTAG AGAATGATT ATATTGTTCA
301 AACATTTGGT GCTCTATT TTGCATGACGT GGGAA

```

SEQ ID NO: 165 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

```

1 TTAGTTAGAA TTTAAATATT AACAAACTAT AACACTATGA TTAAATGCTT GATATTGAGT
61 AGTTATTTA ATAGCCTAAG TCTGGAAATT AAATACTAGT AAGAGAAACT TCTGTGATGT
121 GAGGACATAT AAAGACTAAT TTTTCACTC CACAGGTGAT TTCAGCCACT TTATGAACTG
181 CTGGAAGCAA AAATGAGATC TTT

```

SEQ ID NO: 166 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

```

1 TTATTTTAAT AGCCTAAGTC TGGAAATTAA ATACTAGTAA GAGAACTTC TGTGATGTGA
61 GGACATATAA AGACTAATT TTTTGTGAT TCTAAAATC CCATGTTGTA TACTTATTCT
121 TTTTAAATCT GAAAATATAT TAATCATATA TTGCTAAAT GTCTAATAA TGTTCACTG
181 TAGGTAAGTT AAAATGTATC ACATATATAA TAAACATAGT TATTAATGCA TAGATATTCA
241 GTAAAATTAT GACTTCTAAA TTTCTGTCTA AATATAATAT GCCCTGTAAT ATAATAGAAA
301 TTATTCATAA GAATACATAT ATATTGCTTT ATCAGATATT CTACTTTGTT TAGATCTCTA
361 AATTACATAA ACTTTTATT ACCTCTTCT TGATATGAAT GAAACTCATC AAATATGCGT
421 GTTAGTGTAA ATGAACTTCT ATTAAACTC CACAGGTGAT TTCAGCCACT TTATGAAC

```

SEQ ID NO: 167 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

```

1 TTAGTTAGAA TTTAAATATT AACAAACTAT AACACTATGA TTAAATGCTT GATATTGAGT
61 AGTTATTTA ATAGCCTAAG TCTGGAAATT AAATACTAGT AAGAGAAACT TCTGTGATGT
121 GAGGACATAT AAAGACTAAT TTTTTGTTG ATTCTAAAAA TCCCATGTTG TATACTTATT
181 CTTTTAAAT CTGAAAATAT ATTAATCATA TATTGCTAA ATGTCTTAAT AATGTTTCAC
241 TGTAGGTAAG TTAAAATGTA TCACATATAT AATAAACATA GTTATTAATG CATAGATATT
301 CAGTAAAATT ATGACTTCTA AATTCTGTC TAAATATAAT ATGCCCTGTA ATATAATAGA
361 AATTATTCTA AAGAATACAT ATATATTGCT TTATCAGATA TTCTACTTTG TTTAGATCTC
421 TAAATTACAT AAACTTTAT TTACCTCTT CTTGATATGA ATGAAACTCA TCAAATATGC
481 GTGTTAGTGT AAATGAACCT CTATTTAATT TTGAGGCTCT GCAAAGTTCT CCACAGGTGA
541 TTTCAGCCAC TTTATGAACT GCTGGAAGCA AAAATGAGAT CTTTGCAACA TGAAGCAGTT
601 GCTCAGTTCA TTAAACTGTG TTCAATATT CAGCCATAAC ATACATTAGA GAATGATTAA
661 TATTGTTCAA ACATTTGGTG CTCTATT TTGCATGACGT GGGAA

```

SEQ ID NO: 168 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

```

1 AATACTAGTA AGAGAAACTT CTGTGATGTG AGGACATATA AAGACTAATT TTTTTGTTGA
61 TTCTAAAAAT CCCATGTTGT ATACTTATT CTTTTAAATC TGAAAATATA TTAATCATAT
121 ATTGCCTAAA TGTCTTAATA ATGTTCACT GTAGGTAAGT TAAATGTAT CACATATATA

```

181 ATAAACATAG TTATTAATGC ATAGATATTG AGTAAAATTA TGACTTCTAA ATTTCTGTCT
 241 AAATATAATA TGCCCTGTA TATAATAGAA ATTATTCTATA AGAATACATA TATATTGCTT
 301 TATCAGATAT TCTACTTGT TTAGATCTCT AAATTACATA AACTTTATT TACCTTCTTC
 361 TTGATATGAA TGAAACTCAT CAAATATGCG TGTTAGTGT AATGAACTTC TATTTAATT
 421 TGAGGCTCTG CAAAGTCTT TGAAAGAGCA ACAAAATGGC TTCACCACTC CACAGGTGAT
 481 TTCAGGCCACT TTATGAAC TGCTGGAAAGCAA AAATGAGATC TTTGCAACAT GAAGCAGTTG
 541 CTCAGTTCAT TAAACTGTGT TCAATATTTC AGCCATAACA TACATTAGAG AATGATTAT
 601 ATTGTTCAAA CATT

SEQ ID NO: 169 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 TTGTTAGAA TTTAAATATT AACAAACTAT AACACTATGA TTAAATGCTT GATATTGAGT
 61 AGTTATTTA ATAGCCTAAG TCTGGAAATT AAATACTAGT AAGAGAAACT TCTGTGATGT
 121 GAGGACATAT AAAGACTAAT TTTTTGTTG ATTCTAAAAA TCCCATGTTG TATACTTATT
 181 CTTTTAAAT CTGAAAATAT ATTAATCATA TATTGCTAA ATGCTTTAAT AATGTTTCAC
 241 TGTAGGTAAG TTAAATGTG TCACATATAT AATAAACATA GTTATTAATG CATAGATATT
 301 CAGTAAAATT ATGACTTCTA AATTCTGTC TAAATATAAT ATGCCCTGTA ATATAATAGA
 361 AATTATTCTAT AAGAATACAT ATATATTGCT TTATCAGATA TTCTACTTTG TTTAGATCTC
 421 TAAATTACAT AAACTTTTAT TTACCTTCTT CTTGATATGA ATGAAACTCA TCAAATATGC
 481 GTGTTAGTGT AAATGAACTT CTATTTAATT TTGAGGCTCT GCAAAGTTCT TTGAAAGAGC
 541 AACAAATGG CTCAACTAT CTGAGTGACA CTGTGAAGGA GATGGCCAAG AAAGCACCT
 601 CAGAAATATG CCATTTCAGC CACTTATGA ACTGCTGAA GCAAAATGA GATCTTGCA
 661 ACATGAAGCA GTGCTCAGT TCATTAAC GTGTTCAATA TTTCAGCCAT AACATACATT
 721 AGAGAATGAT TTATATTGTT CAAACATTG GTGCTCTATT TTTGCATGAC GTGGGA

SEQ ID NO: 170 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 GTCTGGAAAT TAAATACTAG TAAGAGAAAC TTCTGTGATG TGAGGACATA TAAAGACTAA
 61 TTTTTTGTT GATTCTAAA ATCCCATGTT GTATACTTAT TCTTTTAAA TCTGAAAATA
 121 TATTAATCAT ATATTGCTA AATGCTTAA TAATGTTCA CTGTAGGTA GTTAAAATGT
 181 ATCACATATA TAATAAACAT AGTTATTAAT GCATAGATAT TCAGTAAAAT TATGACTTCT
 241 AAATTCTGT CAAATATAA TATGCCCTGT AATATAATAG AAATTATTCA TAAGAATACA
 301 TATATATTGC TTTATCAGAT ATTCTACTTT GTTTAGATCT CAAATTACA TAAACTTTA
 361 TTTACCTCT TCTTGATATG AATGAAACTC ATCAAATATG CGTGTAGTG TAAATGAAC
 421 TCTATTTAAT TTTGAGGCTC TGCAAAGTTC TTTGAAAGAG CAACAAATG GCTTCAACTA
 481 TCTGAGTGAC ACTGTGAAGG AGATGGCCAA GAAAGCACCT TCAGAAATAT GCCAGAAATA
 541 TCTGTCAGAA TTTGAAGAGA TTGAGGGGCA CTGGAAGAAA CTTTCCTCCC AGTTGGTGG
 601 AAACACCACT CCACAGGTGA TTTCAGCCAC TTTAT

SEQ ID NO: 171 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 TGGAAATTAA ATACTAGTAA GAGAACTTC TGTGATGTGA GGACATATAA AGACTAATT
 61 TTTTGTGAT TCTAAAATC CCATGTTGTA TACTTATTCT TTTAAATCT GAAAATATAT
 121 TAATCATATA TTGCTAAAT GTCTTAATAA TGTTTCACTG TAGTAAGTT AAAATGTATC
 181 ACATATATAA TAAACATAGT TATTAATGCA TAGATATTCA GTAAAATTAT GACTTCTAAA
 241 TTTCTGTCTA ATATATAATAT GCCCTGTAAT ATAATAGAAA TTATTCTAA GAATACATAT
 301 ATATTGCTTT ATCAGATATT CTACTTTGTT TAGATCTCTA AATTACATAA ACTTTTATT
 361 ACCTTCTCT TGATATGAAT GAAACTCATC AAATATGCGT GTTAGTGTAA ATGAACCTCT
 421 ATTTAATTCTT GAGGCTCTGC AAAGTTCTTT GAAAGAGCAA CAAATGGCT TCAACTATCT
 481 GAGTGACACT GTGAAGGAGA TGGCCAAGAA AGCACCTCA GAAATATGCC AGAAATATCT
 541 GTCAGAATTG GAAGAGATTG AGGGCACTG GAAGAAACTT TCCTCCAGT TGGTGGAAAG
 601 CTGCCAAAG CTAGAAGAAC ATATGAATAA ACTTCGAAAAA TTTCAGGTAA GCCGAGGTTT
 661 GGCCTTAAA CTATATTCTT CCACCTCCACA GGTGATTCA GCCACTTAT GAAC

SEQ ID NO: 172 (Secuencia Mutante de Gen *DMD* de Ratón)

1 CCTAAGTCTG GAAATTAAAT ACTAGTAAGA GAAACTTCTG TGATGTGAGG ACATATAAAG

61 ACTAATTTT TTGTTGATTC TAAAAATCCC ATGTTGTATA CTTATTCTTT TAAATCTGA
 121 AAATATATTA ATCATATATT GCCTAAATGT CTTAATAATG TTCACTGTA GGTAAAGTTAA
 181 AATGTATCAC ATATATAATA AACATAGTTA TTAATGCATA GATATTCACTG AAAATTATGA
 241 CTTCTAAATT TCTGTCTAAA TATAATATGC CCTGTAATAT AATAGAAATT ATTCATAAGA
 301 ATACATATAT ATTGCTTTAT CAGATATTCT ACTTTGTTTA GATCTCTAAA TTACATAAAC
 361 TTTTATTTAC CTTCTTCTTG ATATGAATGA AACTCATCAA ATATGCGTGT TAGTGTAAAT
 421 GAACTTCTAT TTAATTGAA GGCTCTGCAA AGTTCTTGA AAGAGCAACA AAATGGCTTC
 481 AACTATCTGA GTGACACTGT GAAGGAGATG GCCAAGAAAG CACCTTCAGA AATATGCCAG
 541 AAATATCTGT CAGAATTGAA AGAGATTGAG GGGCACTGGA AGAAACTTTC CTCCCAGTTG
 601 GTGGAAAGCT GCCAAAAGCT AGAAGAACAT ATGAATAAAC TTGAAAATT TCAGGTAAAGC
 661 CGAGGTTTGG CCTTTAAACT ATATTTTTC ACATAGCAAT TAATTGGAAA ATGTGATGGG
 721 AAACAGATAT TTTACCCAGA GTCCTCAAA GATATTGATG ATATCAAAG CCAAATCTAT
 781 TTCAAAGGAT TGCAACTTGC CTATTTTCC TATGAAAACA GTAATGTGTC ATACCTTCTT
 841 GGATTGTCTG TATAATGAA TTGATTTTT TTCACCAACT CCAAGTATAC TTAACATT
 901 AACATAATAA TTTAAATAT CCTTATTCCA TTATGTTCAT TTTTAAGTT GTAGATATGA
 961 TTTAGCTCAC AGCATACATA TATACACATG TATTACATAT GCATATATTA TATATATGGC
 1021 AGACATATGT TTTCACTACC ATATTCACT TTTGAATTAT GAATATATGT TTAATTCTG
 1081 CCATATTCC TTCCCTACAT TGACTTCTAT TAATTAGTA TTTCAGTAGT TCTAACACAT
 1141 TAATAATAAC CTAGACTCAA TACAGTAATC TAACAATTAT ATTTGTGCCT GTAATTCTAA
 1201 GTTAGTTAAA TTCATAGGTT GTGTTCTCA TAGTTGGCCA TTTGTGAAAT ATAATAATAT
 1261 CCGAAAAGAA AGTTCAAAAA TGTCATGACT TCATATAGAC AGGTGATTTC AGCCACTTTA
 1321 TG

SEQ ID NO: 173 (pAAV-MDX Plásmido)

1 GGGGGGGGGG GGGGGGGTTG GCCACTCCCT CTCTGCGCGC TCGCTCGCTC ACTGAGGCCG
 61 GGCACAAA GGTGCCCCGA CGCCCGGGCT TTGCCCCGGGC GGCCTCAGTG AGCGAGCGAG
 121 CGCGCAGAGA GGGAGTGGCC AACTCCATCA CTAGGGGTTG CTAGATCTTC ATATGGGT
 181 ATTAGTCATC GCTATTACCA TGATGATGCG GTTTGGCAG TACACCAATG GGCCTGGATA
 241 GCGGTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGTCT CCACCCATT GACGTCAATG GGAGTTGTT
 301 TTGGCACCAA AATCAACGGG ACTTTCAAA ATGTCGAAT AACCCCGCCC CGTTGACGCA
 361 AATGGCCGGT AGGCCTGTAC GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCGTT TAGTGAACCG
 421 TCAGATCACT AGAAGCTTTA TTGCGGTAGT TTATCACAGT TAAATTGCTA GGCAGTCAG
 481 TGCTCTGAC ACAACAGTCT CGAACTTAAG CTGCAGAAGT TGGCTGTAG GCACTGGCA
 541 GGTAAGTATC AAGGTTACAA GACAGGTTA AGGACACCAA TAGAAACTGG GCTTGTGAG
 601 ACAGAGAAGA CTCTTGCCTT TCTGATAGGC ACCTATTGGT CTTACTGACA TCCACTTGC
 661 CTTTCTCTCC ACAGGTAAATT GTGAGGGAT AACATTGAT GTCGCACAGG CCACGGATTA
 721 GGCACCCAG GCTTGACACT TTATGCTTCC GGCTCGATA TTGTGAGCGG
 781 ATAACAATTT CACACAGGAG ATATATATAT GGCTAGGCC ACCATGGCAC CGAAGAAGAA
 841 GCGCAAGGTG CATGATAA CAAAATATAA TAAAGAGTTT TTACTCTACT TAGCAGGGTT
 901 TGTAGACGGT GACGGTCCA TCTTGCCTG TATCCATCCT AGTCAAGCGT ATAAGTTCAA
 961 GCACCCGGTG ACTCTCCATT TCACGGTCAC TCAGAAGACA CAGCGCCGTT GTGGCAGCG
 1021 CAAGCTGGTG GACGAGATCG GTGTTGGTTA CGTGCAGGAC GTGGCAGCG TCTCCCAGTA
 1081 CGGGCTGTCC CAGATCAAGC CTTTGATCAA TTTTTAAACA CAACTACAAC CTTTTCTAAA
 1141 ACTAAAACAA AAACAAGCAA ATTTAGTTT AAAAATTATT GAACAACCTTC CGTCAGCAA
 1201 AGAATCCCCG GACAATTCT TAGAAGTTTG TACATGGGTG GATCAAATTG CAGCTCTGAA
 1261 TGATTGAAAG ACCCGTAAAA CAACTCTGA AACCGTTCGT GCTGTGCTAG ACAGTTTAC
 1321 AGGATCCGTG GGAGGTCTAT CGCCATCTCA GGCATCCAGC GCCGCATCCT CGGCTTCC
 1381 AAGCCGGGT TCAGGGATCT CGGAAGCACT CAGAGCTGGA GCAGGGTCCG GCACTGGATA
 1441 CAACAAGGAA TTCCCTGCTCT ACCTGGGGG CTTCGTCGAC GGGGACGGCT CCATCTCTGC
 1501 CACTATCGCT CCGGCTCAGT ATGGTAAGTT CAAGCACTAT CTGGGGCTCC GTTCTATGT
 1561 CAGTCAGAAG ACACAGCGCC GTGGTTCCCT CGACAAGCTG GTGGACGAGA TCGGTGTGGG
 1621 TTACGTGAGT GACCAGGGCA GCGTCTCCAG GTACTGTCTG TCCCAGATCA AGCCTCTGCA
 1681 CAACTTCCG ACCCAGCTCC AGCCCTTCCT GAAGCTCAAG CAGAAGCAGG CCAACCTCGT
 1741 GCTGAAGATC ATCGAGCAGC TGCCCTCCGC CAAGGAATCC CCGGACAAGT TCCGGAGGT
 1801 GTGCACCTGG GTGGACGAGA TCGCCGCTCT GAACGACTCC AAGACCGCA AGACCACTTC
 1861 CGAAACCGTC CGCGCCGTTC TAGACAGTCT CTCCGAGAAG AAGAAGTCGT CCCCCTAAGG
 1921 TACCAGCGGC CGCTTCGAGC AGACATGATA AGATACATTG ATGAGTTGG ACAAAACCACA
 1981 ACTAGAATGC AGTAAAAAA ATGCTTTATT TGTAAGCTAT TGCTTTATT

2041 GTAACCATA TAAGCTGCAA TAAACAAAGTT GTATTAGTCA TCGCTATTAC CATGATGATG
 2101 CGGTTTGGC AGTACACCAA TGGCGTGGA TAGCGGTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT
 2161 CTCCACCCCA TTGACGTCAA TGGGAGTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA
 2221 AAATGTCGTA ATAACCCCGC CCCGTTGACG CAAATGGCG GTAGGCCTGT ACGGTGGGAG
 2281 GTCTATATAA GCAGAGCTCG TTTAGTGAAC CGTCAGATCA CTAGAAGCTT TATTGCGGTA
 2341 GTTATCACA GTTAAATTGC TAGCGCAGTC AGTGCTTCTG ACACAACAGT CTCGAACCTA
 2401 AGCTGCAGAA GTTGGTCGTG AGGCACTGGG CAGGTAAGTA TCAAGGTTAC AAGACAGTT
 2461 TAAGGACACC AATAGAAACT GGGCTTGTG AGACAGAGAA GACTCTGCG TTTCTGATAG
 2521 GCACCTATTG GTCTTACTGA CATCCACTTT GCCTTCTCT CCACAGGTAA TTGTGAGCGG
 2581 ATAACAATTG ATGTCGCACA GGCCACGGAT TAGGCACCCC AGGCTTGACA CTTTATGCTT
 2641 CCGGCTCGTA TATTGTTGG AATTGTCAGC GGATAACAA TTACACACAGG AGATATATAT
 2701 ATGGGCTAGG CCACCATGGC ACCGAAGAAG AAGCGCAAGG TGCATATGAA TACAAAATAT
 2761 AATAAAGAGT TCTTACTCTA CTTAGCAGGG TTTGTAGACG GTGACGGTTC CATCTATGCC
 2821 TGTATCAGGC CGACGCAGAG TGTGAAGTTC AAGCACGATC TGCTGCTCTG TTTCGATGTC
 2881 TCTCAGAAGA CACAGCGCCG TTGGTTCCTC GACAAGCTGG TGGACGAGAT CGGTGTGGGT
 2941 TACGTGTATG ACCGTGGCAG CGTCTCCTCG TACAGGCTGT CCGAGATCAA GCCTTGCAT
 3001 AATTTTTAA CACAACATACA ACCTTTCTA AAACAAAAAC AAAAACAAAGC AAATTTAGTT
 3061 TTAAAAATTAA TTGAACAAC TCCGTCAGCA AAAGAACCCC CGGACAAATT CTTAGAAGTT
 3121 TGTACATGGG TGGATCAAAT TGCAGCTCTG AATGATTGCA AGACCGTAA ACAACATTCT
 3181 GAAACCGTTC GTGCTGTGCT AGACAGTTA CCAGGATCCG TGGGAGGTCT ATGCCATCT
 3241 CAGGCATCCA GCGCCGCATC CTCGGCTTCC TCAAGCCCGG GTTCAGGGAT CTCCGAAGCA
 3301 CTCAGAGCTG GAGCAGGTTC CGGGCACTGGG TACAACAAGG AATTCTGCT CTACCTGGCG
 3361 GGCTTCGTCG ACGGGGACGG CTCCATCTGG GCCTCGATCG AGCCTAGGCA ACAGTCTAAG
 3421 TTCAAGCACC AGCTGCGGCT CGGGTTCTCG GTCTATCAGA AGACACAGCG CCGTTGGTTC
 3481 CTCGACAAGC TGGTGGACGA GATCGGTGTG GGTTACGTGC GTGACACTGG CAGCGTCTCC
 3541 TGTACTGTC TGTCCCAGAT CAAGCCTCTG CACAACCTCC TGACCCAGCT CCAGCCCTTC
 3601 CTGAAGCTCA AGCAGAAAGCA GGCCAACCTC GTGCTGAAGA TCATCGAGCA GCTGCCCTCC
 3661 GCCAAGGAAT CCCCGGACAA GTTCCCTGGAG GTGTGCACCT GGGTGGACCA GATGCCGCT
 3721 CTGAACGACT CCAAGACCCG CAAGACCACT TCCGAAACCG TCCGCGCCGT TCTAGACAGT
 3781 CTCTCCGAGA AGAAGAAAGTC GTCCCCCTAA GGTACCAAGC GCGCGTTCGA GCAGACATGA
 3841 TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA CAACTAGAAT GCAGTAAAAA AAATGCTTTA
 3901 TTTGTGAAAT TTGTGATGCT ATTGCTTTAT TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAAACAAAG
 3961 TTAACAACAA CAATTGCAATT CATTTATGT TTCAGGTTCA GGGGGAGATG TGGGAGGTTT
 4021 TTTAAAGCAA GTAAAACCTC TACAAATGTC GTAAAATGCA TAAGGATCTA GGAACCCCTA
 4081 GTGATGGAGT TGGCCACTCC CTCTCTGCG GCTCGCTCG TCACTGAGGC CGCCCGGGCA
 4141 AAGCCCGGGC GTCGGGGCAG CTTTGGTCGC CCGGCCTCAG TGAGCGAGCG AGCGCGCAGA
 4201 GAGGGAGTGG CCAACCCCCC CCCCCCCCCC CCTGCAGCCT GGCAGTAATAG CGAAGAGGCC
 4261 CGCACCGATC GCCCCCTCCA ACAGTTGCGT AGCCTGAATG GCGAATGGCG CGACGCC
 4321 TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC GGCGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGC CGCTACACTT
 4381 GCCAGCGCCC TAGCGCCCGC TCCCTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTCTCGC CACGTTGCC
 4441 GGCTTCCCCC GTCAAGCTCT AAATCGGGGG CTCCCTTAG GGTCCGATT TAGTGCTTTA
 4501 CGGCACCTCG ACCCCAAAAA ACTTGATTAG GGTGATGGTT CACGTAGTGG GCCATGCC
 4561 TGATAGACGG TTTTTCGCC TTTGACGTTG GAGTCCACGT TCTTAAATAG TGGACTCTTG
 4621 TTCCAAACTG GAACAACACT CAACCCCTATC TCGGTCTATT CTTTTGATTT ATAAGGGATT
 4681 TTGCGGATT CGGCCTATTG GTTAAAAAAAT GAGCTGATTT AACAAAATT TAACCGAAT
 4741 TTTAACAAA TATTAACGTT TACAATTTC TGATGCGCTA TTTTCTCCTT ACGCATCTGT
 4801 GCGGTATTC ACACCGCATA TGGTGCACTC TCAGTACAAT CTGCTCTGAT GCGCATAGT
 4861 TAAGCCAGCC CCGACACCCG CCAACACCCG CTGACGCC CGACGGGCT TGTCTGCTCC
 4921 CGGCATCCGC TTACAGACAA GCTGTGACCG TCTCCGGGAG CTGCATGTGT CAGAGGTTT
 4981 CACCGTCATC ACCGAAACGC GCGAGACGAA AGGGCCTCGT GATACGCCTA TTTTTATAGG
 5041 TTAATGTCAT GATAATAATG GTTCTTAGA CGTCAGGTGG CACTTTCCGG GGAAATGTGC
 5101 GCGGAACCCC TATTGTTTA TTTTCTAAA TACTTTCAA TATGTATCCG CTCATGAGAC
 5161 AATAACCTG ATAAATGCTT CAATAATATT GAAAAGGAA GAGTATGAGT ATTCAACATT
 5221 TCCGTGTCGC CCTTATTCCC TTTTTGCGG CATTGCGCT TCCGTGTTTT GCTCACCCAG
 5281 AAACGCTGGT GAAAGTAAA GATGCTGAAG ATCAGTTGGG TGCACGAGTG GGTTACATCG
 5341 AACTGGATCT CAACAGCGGT AAGATCCTG AGAGTTTCG CCCCCGAGAA CGTTTCCAA
 5401 TGATGAGCAC TTTTAAAGTT CTGCTATGTG GCGCGGTATT ATCCCGTATT GACGCCGGC
 5461 AAGAGCAACT CGGTGCGCCGC ATACACTATT CTCAGAATGA CTTGGTTGAG TACTCACCAG
 5521 TCACAGAAAA GCATCTTACG GATGGCATGA CAGTAAGAGA ATTATGCACT GCTGCCATAA

5581 CCATGAGTGA TAACACTGCG GCCAACTTAC TTCTGACAAC GATCGGAGGA CCGAAGGAGC
 5641 TAACCGCTTT TTTGCACAAC ATGGGGGATC ATGTAACTCG CCTTGATCGT TGGGAACCGG
 5701 AGCTGAATGA AGCCATACCA AACGACGAGC GTGACACCAC GATGCCTGTA GCAATGGCAA
 5761 CAACGTTGCG CAAACTATTA ACTGGCGAAC TACTTACTCT AGCTTCCCGG CAACAATTAA
 5821 TAGACTGGAT GGAGGGCGGAT AAAGTTGCAG GACCACCTCT GCGCTCGGCC CTTCCGGCTG
 5881 GCTGGTTTAT TGCGGATAAA TCTGGAGCCG GTGAGCGTGG GTCTCGCGGT ATCATTGCAG
 5941 CACTGGGCC AGATGGTAAG CCCTCCCGTA TCGTAGTTAT CTACACGACG GGGAGTCAGG
 6001 CAACTATGGA TGAACGAAAT AGACAGATCG CTGAGATAGG TGCTCTACTG ATTAAGCATT
 6061 GGTAACTGTC AGACCAAGTT TACTCATATA TACTTTAGAT TGATTTAAA CTTCATTTT
 6121 AATTAAAAG GATCTAGGTG AAGATCCTT TTGATAATCT CATGACCAAA ATCCCTTAAC
 6181 GTGAGTTTC GTTCCACTGA GCGTCAGACC CCGTAGAAAA GATCAAAGGA TCTTCTTGAG
 6241 ATCCTTTTT TCTGCGCGTA ATCTGCTGCT TGAAACAAA AAAACCACCG CTACCAGCGG
 6301 TGGTTGTTT GCCGGATCAA GAGCTACCAA CTCTTTTCC GAAGGTAAC GGCTTCAGCA
 6361 GAGCGCAGAT ACCAAATACT GTCCTCTAG TGTAGCCGT GTAGGCCAC CACTTCAAGA
 6421 ACTCTGTAGC ACCGCCTACA TACCTCGCTC TGCTAATCCT GTTACCACTG GCTGCTGCCA
 6481 GTGGCGATAA GTCGTGTCTT ACCGGGGTTGG ACTCAAGACG ATAGTTACCG GATAAGGCGC
 6541 AGCGGTCGGG CTGAACGGGG GTTCTGTGCA CACAGCCCAG CTTGGAGCGA ACGACCTACA
 6601 CCGAACTGAG ATACCTACAG CGTGAGCATT GAGAAAGCGC CACGCTTCCC GAAGGGAGAA
 6661 AGGGGGACAG GTATCCGGTA AGCGGGCAGGG TCGGAACAGG AGAGCGCACG AGGGAGCTTC
 6721 CAGGGGGAAA CGCCTGGTAT CTTTATAGTC CTGTCGGTT TCGCCACCTC TGACTTGAGC
 6781 GTCGATTTTT GTGATGCTCG TCAGGGGGGC GGAGCCTATG GAAAAACGCC AGCAACGCGG
 6841 CCTTTTACG GTTCCTGGCC TTTTGCTGCC CTTTGCTCA CATGTTCTT CCTGCGTTAT
 6901 CCCCTGATTC TGTGGATAAC CGTATTACCG CCTTTGAGTG AGCTGATA

SEQ ID NO: 174 (cebador directo Intrón 22 de DMD de ratón)

1 CATTTCATAT TTAGTGACAT AAGATATGAA GTATG

SEQ ID NO: 175 (cebador reverso DMD Intrón 23 de ratón)

5 1 GTGTCAGTAA TCTCTATCCC TTTCATG

SEQ ID NO: 176 (Secuencia Mutante de Gen DMD de Ratón)

1 CATTTCATAT TTAGTGACAT AAGATATGAA GTATGATTAT TCAGCCACTT TATGAACTGC
 61 TGGAAAGCAAA AATGAGATCT TTGCAACATG AAGCAGTTGC TCAGTTCATT AAAACTGTGTT
 121 CAATATTTCAT GCCATAACAT ACATTAGAGA ATGATTATA TTGTTCAAAC ATTTGGTGC
 181 CTATTTCATG ATGACGTGGG ATAAACACA GCACCAACAA TCAAACAATT GCAAAGATGT
 241 ATTACAAGTA TTTTTCTTT TTAAACAGG AAAGTATACT TATATTTCAT TTGTCCAAAC
 301 CATCATGAAA GGGATAGAGA TTACTGACAC

SEQ ID NO: 177 (Secuencia Mutante de Gen DMD de Ratón)

1 CATTTCATAT TTAGTGACAT AAGATATGAA GTATGATTAT TAAAATTAAA TCACATTATT
 61 TTATTATAAT TACTTTACTC CACAGGTGAT TTCAGCCACT TTATGAACTG CTGGAAGCAA
 121 AAATGAGATC TTTGCAACAT GAAGCAGTTG CTCAGTTCAT TAAACTGTGT TCAATATTTC
 181 AGCCATAACA TACATTAGAG AATGATTAT ATTGTTCAA CATTGGTGC TCTATTTCAT
 241 CATGACGTGG GATTAAACAC AGCACCAACA ATCAAACAAAT TGCAAAGATG TATTACAAGT
 301 ATTTTTCTTT TTAAACAGG GAAAGTATAAC TTATATTTCAT ATTGTCCAAA CCATCATGAA
 361 AGGGATAGAG ATTACTGACA C

SEQ ID NO: 178 (Secuencia Mutante de Gen DMD de Ratón)

1 CATTTCATAT TTAGTGACAT AAGATATGAA GTATGATTAT TAAAATTAAA TCACATTATT
 61 TTATTATAAT TACTTTACAC AGGTGATTTC AGCCACTTTA TGAACGTGCTG GAAGCAAAAA
 121 TGAGATCTTT GCAACATGAA GCAGTTGCTC AGTTCATCAA ACTGTGTTCA ATATTTCAGC
 181 CATAACATAC ATTAGAGAAT GATTATATT GTTCAAACAT TTGGTGCCTCT ATTTTGCT
 241 GACGTGGGAT TAAACACAGC ACCAACAAATC AAACAATTGC AAAGATGTAT TACAAGTATT
 301 TTTTCTTTTT AAAACAGGAA AGTACTTA TATTTCATT GTCCAAACCA TCATGAAAGG
 361 GATAGAGATT ACTGACAC

REIVINDICACIONES

1. Una composición para su uso en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne asociada con un cambio del marco de lectura en un gen de la distrofina en un sujeto que lo necesita, comprendiendo la composición:

- 5 (i) una primera nucleasa que corta una primera secuencia de reconocimiento o ARN o ADN que codifica dicha primera nucleasa; y
 (ii) una segunda nucleasa que corta una segunda secuencia de reconocimiento o ARN o ADN que codifica dicha segunda nucleasa;

en la que dicha primera secuencia de reconocimiento está dentro de un intrón que es adyacente y 5' corriente arriba de un primer exón en el gen de la distrofina de una célula muscular de dicho sujeto;
 10 en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento está dentro de un intrón que es adyacente y 3' corriente abajo de dicho primer exón en el gen de la distrofina de una célula muscular de dicho sujeto;
 en la que dicha primera secuencia de reconocimiento y dicha segunda secuencia de reconocimiento tienen salientes complementarias cuando se cortan mediante dicha primera nucleasa y dicha segunda nucleasa; y
 15 en la que dicha primera nucleasa y dicha segunda nucleasa son capaces de eliminar dicho primer exón de dicho gen de distrofina en dicha célula muscular de manera que se restaure el marco de lectura normal de dicho gen de distrofina.

2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que dicho primer exón es el exón 44, el exón 45 o el exón 51.

3. La composición para el uso de la reivindicación 2, en la que dicho primer exón es el exón 44 y en la que:

- 20 (a) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 2, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 38;
 (b) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 3, 11, 17, 21 y 27, y dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 29 y 41;
 (c) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 5, y dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 31;
 25 (d) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 8 y 12, y dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 32, 37, 43 y 44;
 (e) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de SEQ ID NO: 14 y 26, y dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 34;
 (f) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 18, y dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 36;
 30 (g) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 19, y dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 42;
 (h) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 20, y dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 40;
 35 (i) dicha primera secuencia de reconocimiento es la SEQ ID NO: 23, y dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 30 y 35; o
 (j) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 28, y dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 33.

4. La composición para el uso de la reivindicación 2, en la que dicho primer exón es el exón 45 y en la que:

- 40 (a) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de SEQ ID NO: 50, 51, 53 y 56, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 73;
 (b) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 54 y 60, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es la SEQ ID NO: 67;
 (c) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 55, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 66; o
 45 (d) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 62, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 74.

5. La composición para el uso de la reivindicación 2, en la que dicho primer exón es el exón 51 y en la que:

- 50 (a) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 76, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 134;
 (b) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 78 y 83, y en el que dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 110, 111 y 117;
 (c) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de SEQ ID NO: 79 y 82, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 119;
 55 (d) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 85 y 99, y en el que dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 120, 124 y 131;
 (e) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 87, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 126;

- (f) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 88, 93 y 103, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es la SEQ ID NO: 114
- (g) dicha primera secuencia de reconocimiento se selecciona de SEQ ID NO: 89 y 100, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 128
- 5 (h) dicha primera secuencia de reconocimiento es la SEQ ID NO: 91, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 108, 127 y 133;
- (i) dicha primera secuencia de reconocimiento es la SEQ ID NO: 92, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 116 y 129;
- 10 (j) dicha primera secuencia de reconocimiento es la SEQ ID NO: 96, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 112, 123 y 130;
- (k) dicha primera secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 97, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento es SEQ ID NO: 118; o
- (l) dicha primera secuencia de reconocimiento es la SEQ ID NO: 105, y en la que dicha segunda secuencia de reconocimiento se selecciona de las SEQ ID NO: 106 y 107.
- 15 6. La composición para su uso de la reivindicación 3, en la que dicha primera nucleasa es SEQ ID NO: 135 y dicha segunda nucleasa es SEQ ID NO: 136.
7. La composición para su uso de la reivindicación 4, en la que dicha primera nucleasa es SEQ ID NO: 137 y dicha segunda nucleasa es SEQ ID NO: 138.
- 20 8. La composición para su uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición comprende un virus adenoasociado recombinante (AAV) que contiene los genes que codifican dicha primera y segunda nucleasas.

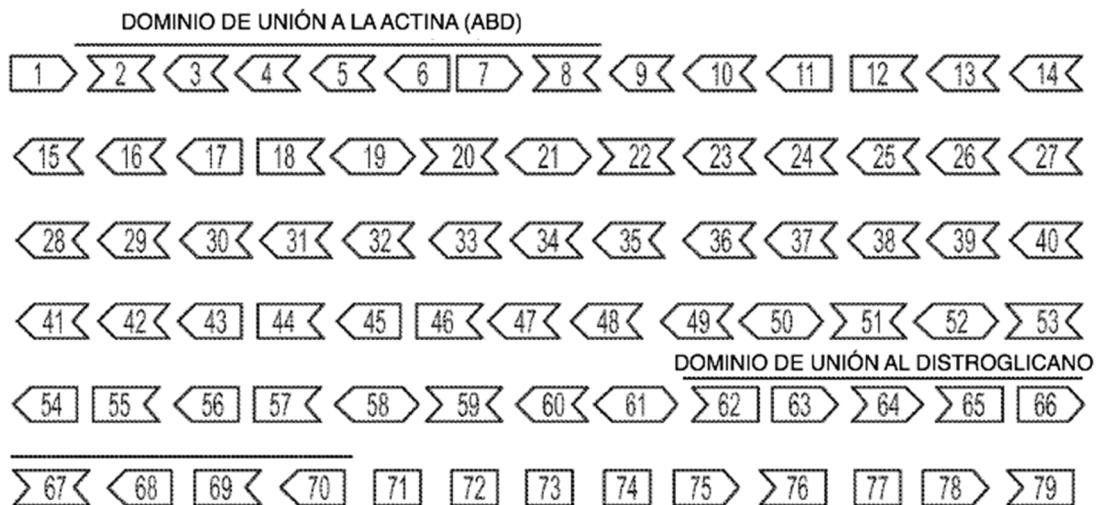


FIG. 1

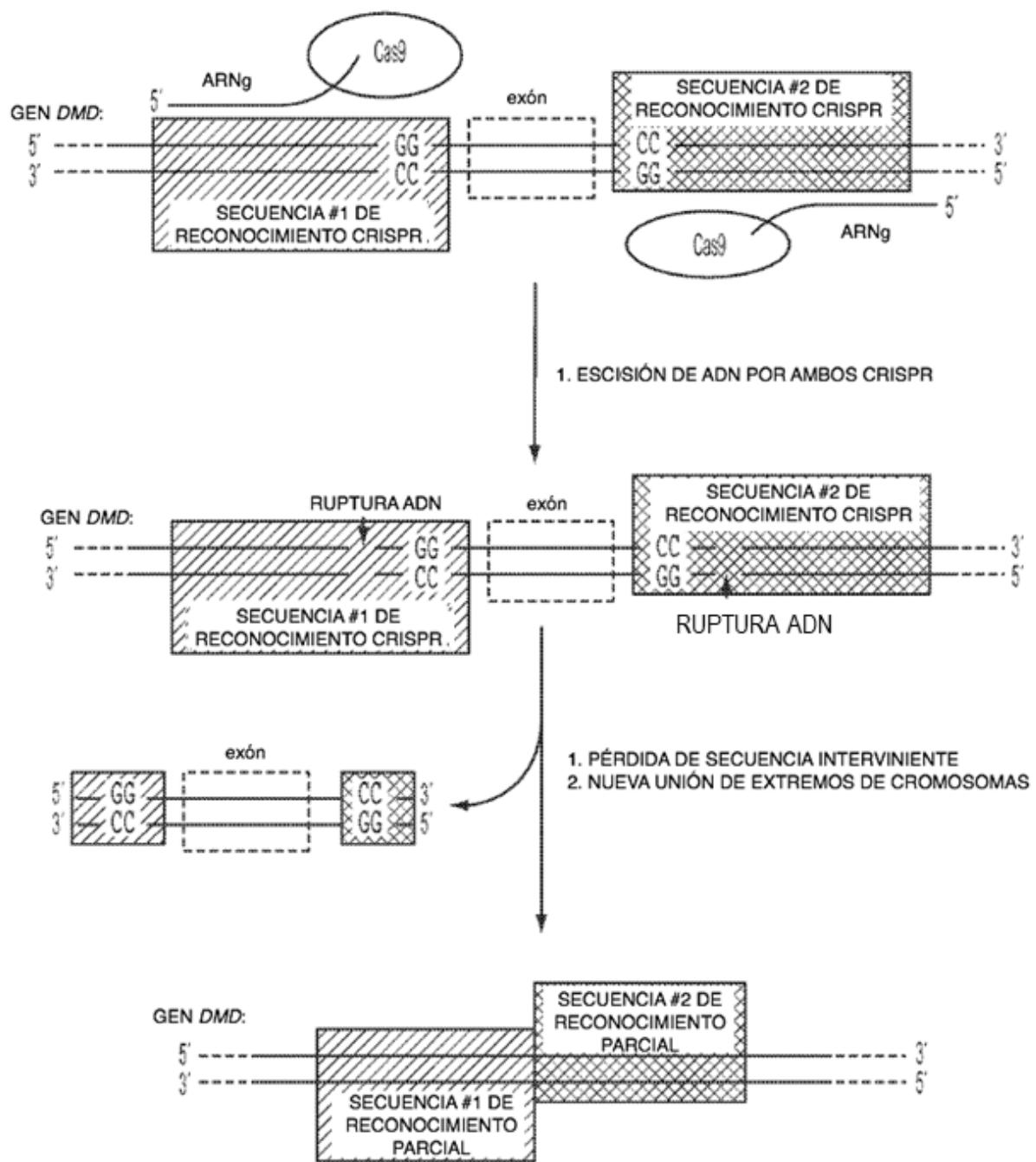


FIG. 2A

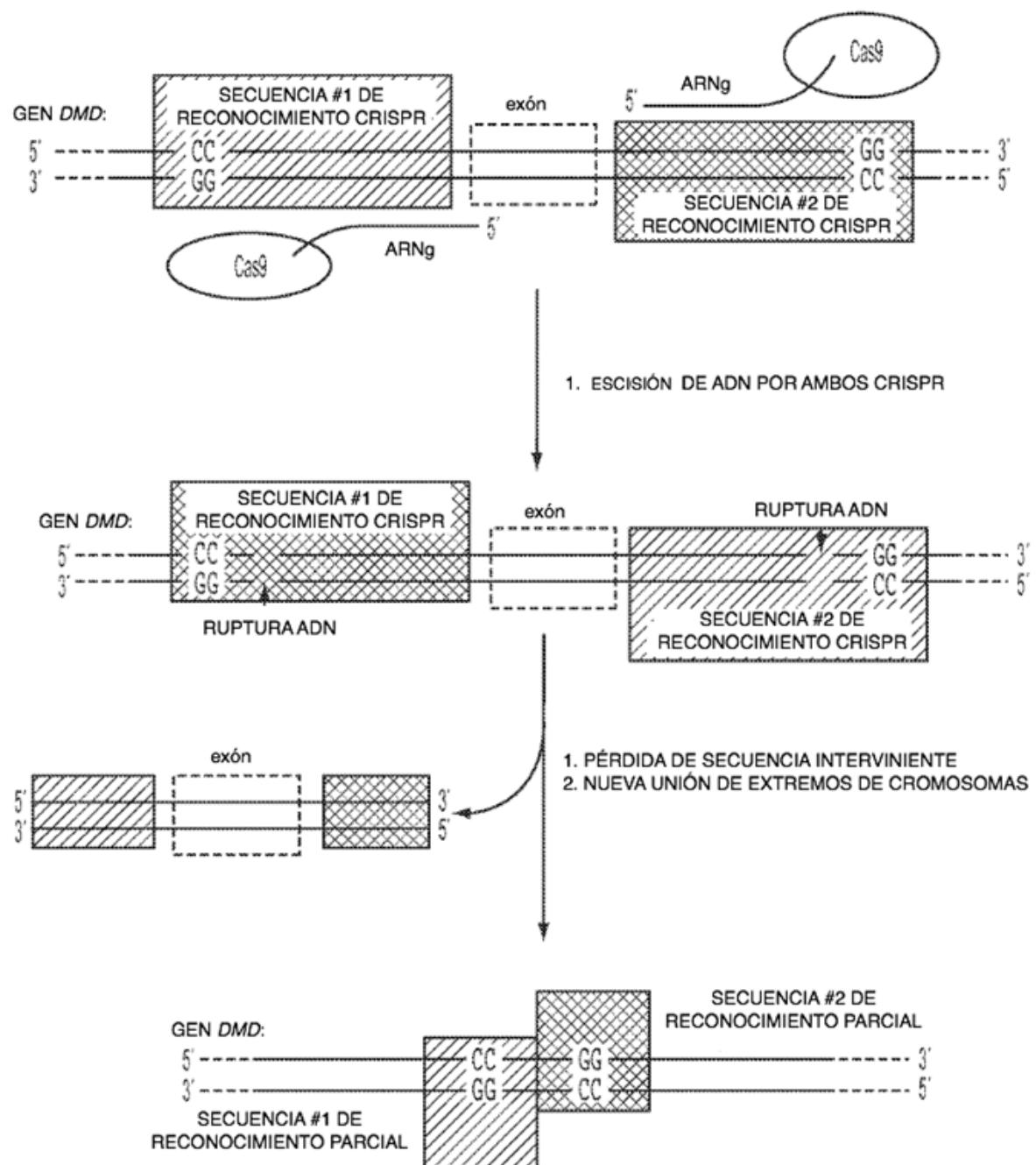


FIG. 2B

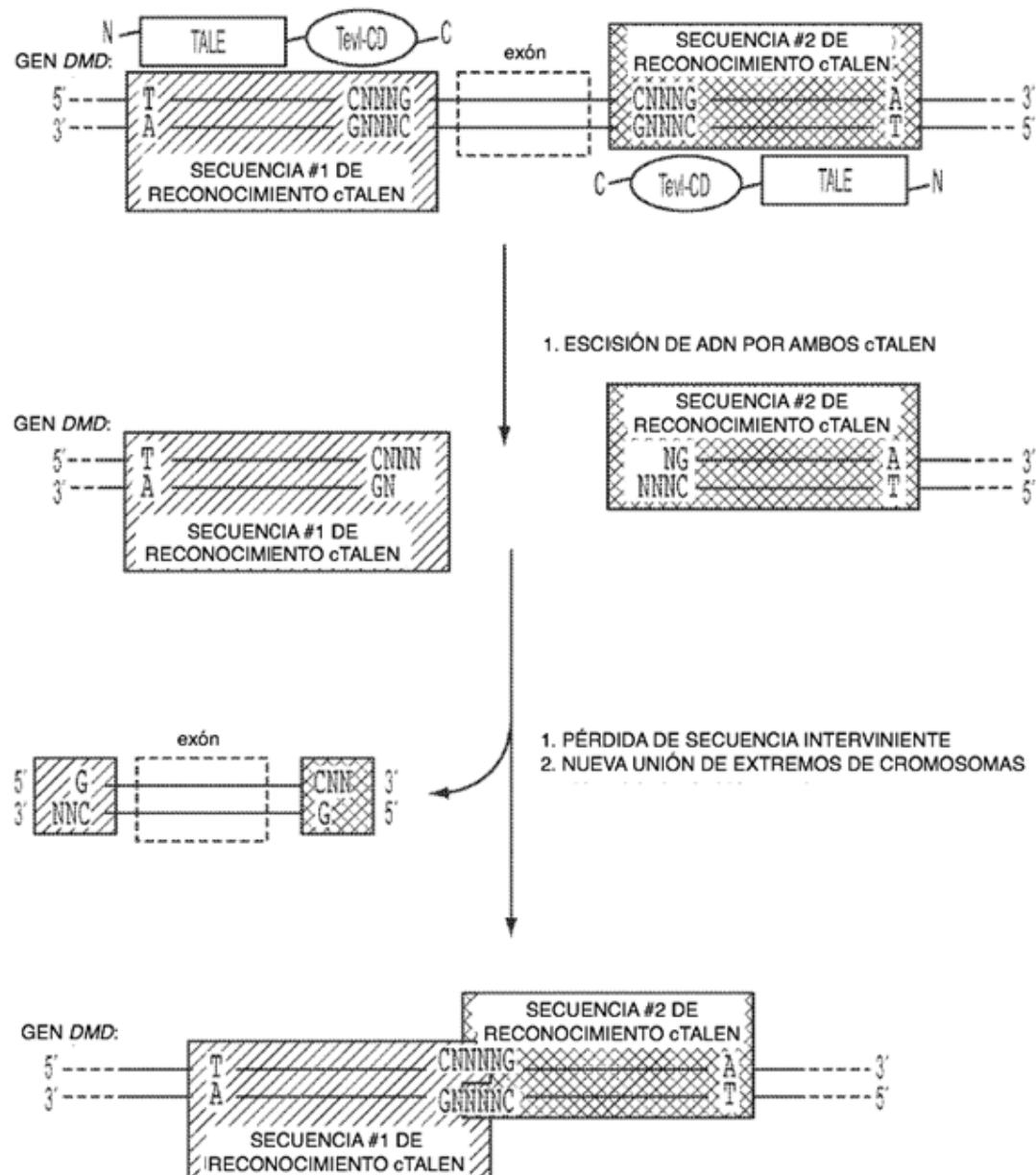


FIG. 2C

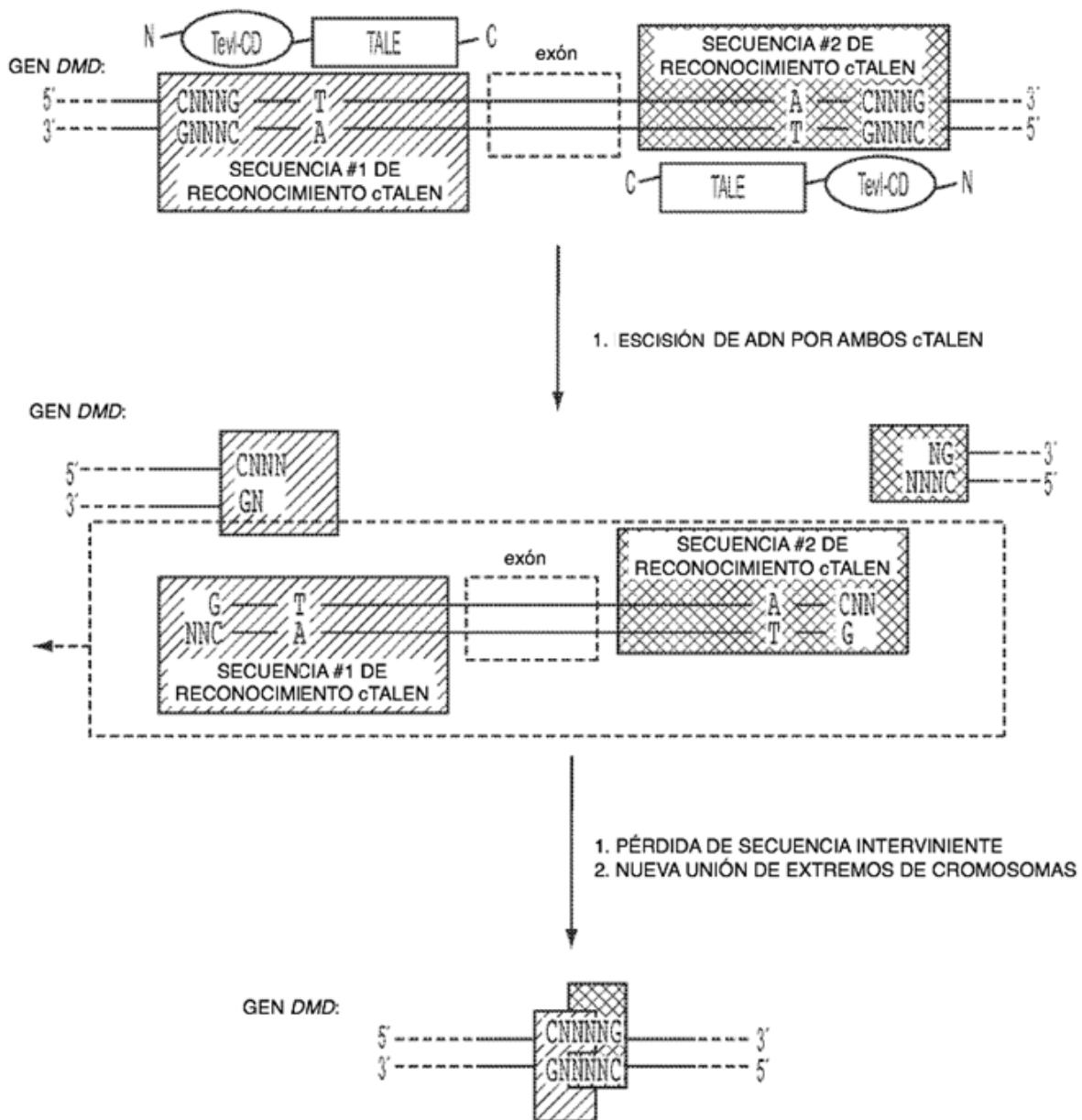


FIG. 2D

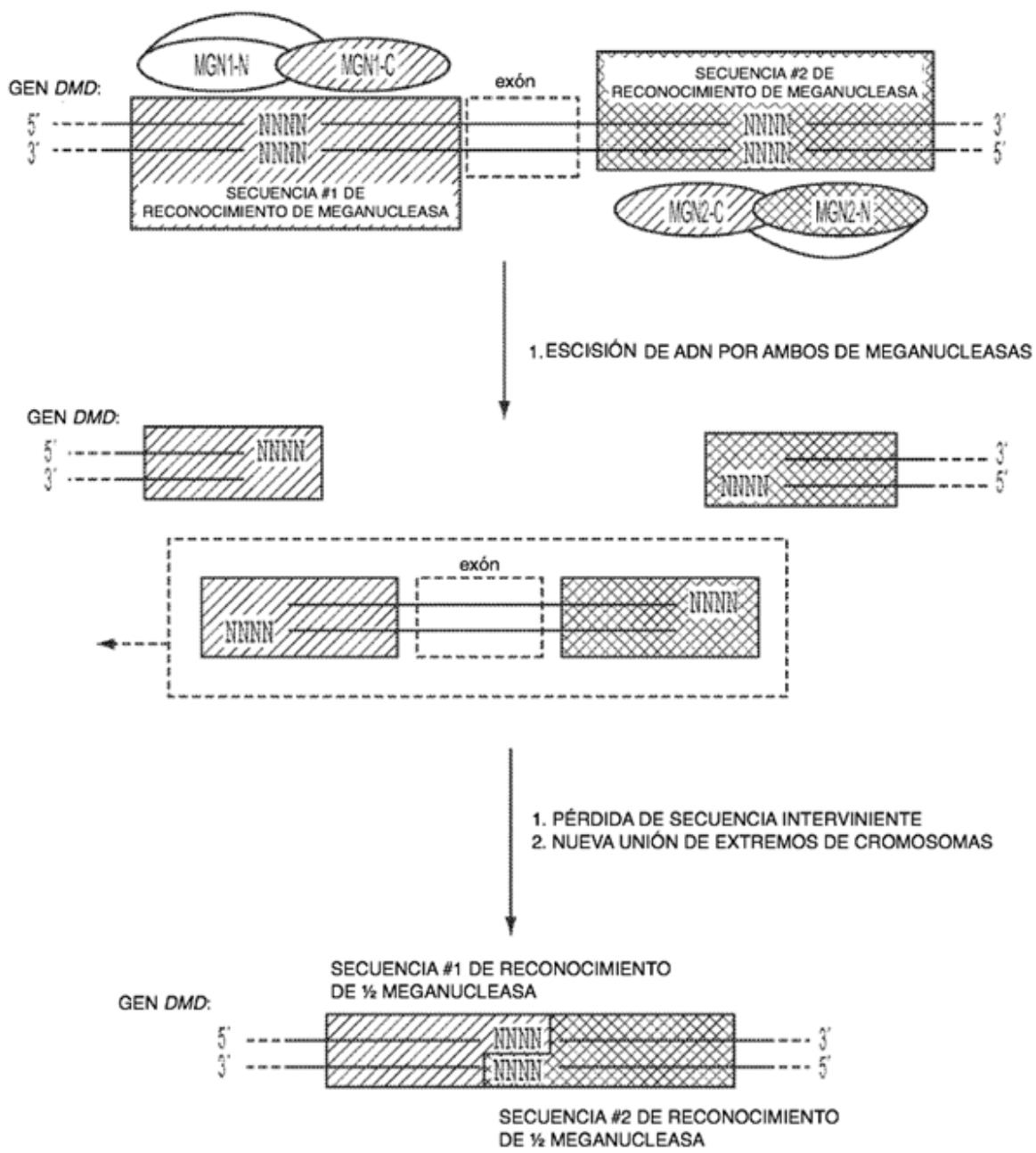
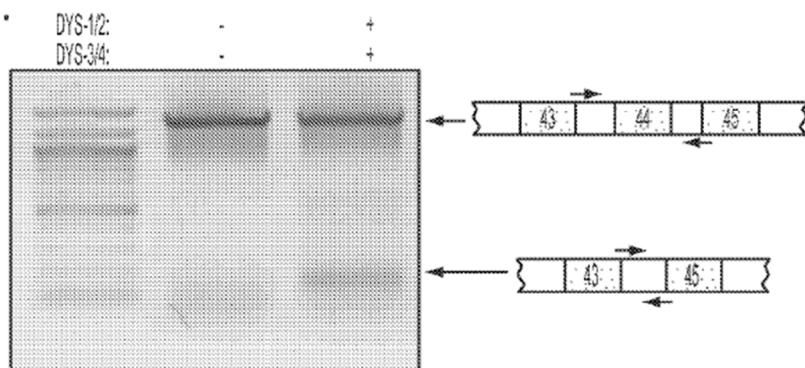


FIG. 2E

A.

GAAAGAAAATGCCAATAGTCCAAAATAGTTGCTTATCTTCTTTAATCAATAAATATTCATTAAAGGGAAAATTGCAACCTTC
 CATTTAAAATCAGCTTTATATTGAGTATTCTTAAATGTTGTTGTCATGCTAGGTTGTTGATATTAAATTCTTATTTGTTACTTGAAA
 CTAAACTCTGCAAATGCAGGAAACTATCAGACTGATATCTTCTCACTATAACCAAAAATATACGCTATATCTCTATAATCTGTTTA
 CATAATCCATCTATTTCCTGATCCATATGCTTTACCTGCAGGCGATTGACAGATCTGTTGAGAAATGGGGCGTTTCAATTGAT
 ATAAAGATAATTAAATCAGTGGCTAACAGAACGCTGAACAGTCTCAGAAGACACAAATTCTGAGAATTGGAACCTGCTAAATACA
 AATGGTATCTTAAGGTAAGTCTTGTATTCTTCTGAAATTGTATTCTTCAGCACATCTGGACTCTTAACTCTTAAAGATCAG
 GTTCTGAAAGGGTGTGGAAATTACTTTGACTGTTGTTGTCATCATTATATTACTAGAAAGAAAATTATCATAATGATAATTAGAGC
 ACGGTGCTATGGACTTTTGTCTCAGGATGAGAGGTTGCTGGACGGAGCTGGTTATCTGATAAACTGCAAAATATAATTGAACT
 TGTGACAGAGGAAGCATGTAACACCAAGGTGTTGGCTTGGGCACTGTGTATTTCGGCTTATGTGGAACCTTCCAGA
 AGGAGAACTTGTGGCATACTTAGCTAAATGAAGTTGCTAGAAATTATCCATCATGATAAAATTACAGTTCTGTTTCTAAAGACAATT
 TTGTTAGTGCTGTAGCAATTCTATATATTCTATTGACAAAATGCTCTGAAATAGTCAGAGGCCAAACAATGCAAGAGTTATTG
 GTGTTACTTATGCTACATTATGGTTATGTTAATAGGAAACACCATATGGATGATAACCAACTGCTGTAGTTAATTCAACTGTGTT
 GTCTTTGAATATG

B.



C.



FIG. 3

A.

CTAACCGAGAGGGTGTCTTCCCTGACACATAAAAGGTGCTTCTGTCTGTATCCTTGGATATGGGATGTCAGTTCATAGG
 AAATTTACATGGAGCTTGTATTCCTTCTTGCAGTACAACAGTGGCATGGTAGCACACTGTTAATCTTCTCAAATAAAAAGA
 CATGGGGCTTCATTTGTTTGCCTTTGGTATCTTACAGGAACCTCCAGGATGGCATTGGCAGCGGAAACTGTTGTCAAACATT
 GAATGCAACTGGGAAGAAATAATTACAGCAATCCTCAAAACAGATGCCAGTATTCTACAGAAAAATTGGAAGCCTGAATCTGCG
 GTGGCAGGAGGCTGCAAACAGCTGCAAGACAGAAAAAGAGGTAGGGCAGAGATCTAATAGGAATGAAAACATTAGCAGACT
 TTTAAGCTTCTTCTAGAAGAAATTTCATGAGAGATTAAAGCAGGGTAAAGGCACAACTAAAGAACCTATCAACCAATTAAATCA
 ACAGCAGTAAAGAAATTTCATATACTAAATAATATAACTTGTGGCTAGTTAGTGGTTCTGCTATTAAACTGAAACTTGA
 AGTTGCTTAAANTCACCATGCTAAAGGTGAATATCTCAATATAATTAAACTCAACAGCTGAATCTCAGTTGTTTCA
 AGAAGATTAGAAGCAATTATAATGATTGTTGTAGGAAAGACAGATCTTGTAGTTAAAATAGCTATGAATATGACTAT
 GAAGCTAAAAAGTGTAGTGTCACTTACCTCTAGTTACCCACATTGTGAATACATTCTGAAGGGAACTTGAGCCAAAGAGGT
 ACAAGTTAATGGGAAACAAACCTCAAAAGTTACTGTCAAATTCAATCATCATTTAAATTCCCTGGAAATGATTGAAGGCA
 CAGAAAGCCAATGCGTGTGCTGAGTTGAAAGCCTAGAGAGTTATAAATGGGATTGTATTATGCTTCAGTTGTTGATGTTA
 ATGTTGCTTGTGCTAAAGGAAGACTTGGCTTATTACCAAAATGAGACTATTGTTATGAACAACTGAAACTTGTCTTTGCCAA
 GCTCTTGATCCCACCCATCATCCACATAATAGGTGGATTAAATTCAAGGAAGCTAGAACACTATTGTGAATATCTTGTAA
 GATGTATTAAAAGAAGATTGGATTATGTCAGTTGCTTGTGCCCACCTCTTTCCCTCTTATTGTACATTATCAGAAAG
 TAGATACAATTCAATTGTGAAACACATTAGTTGACCTAAACAC

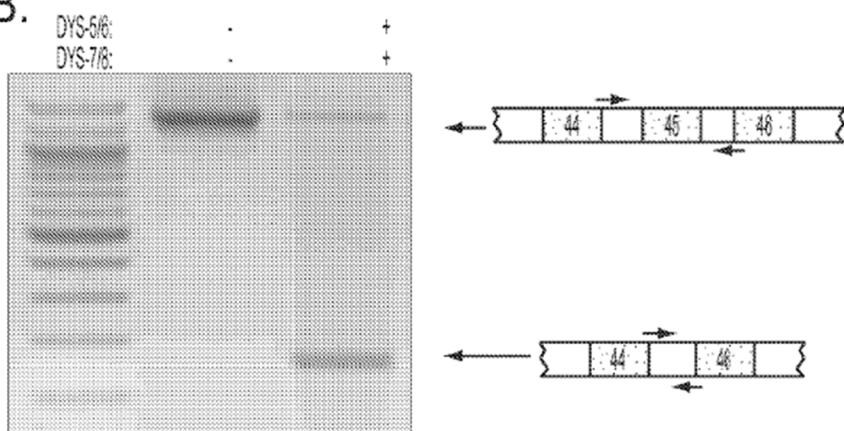
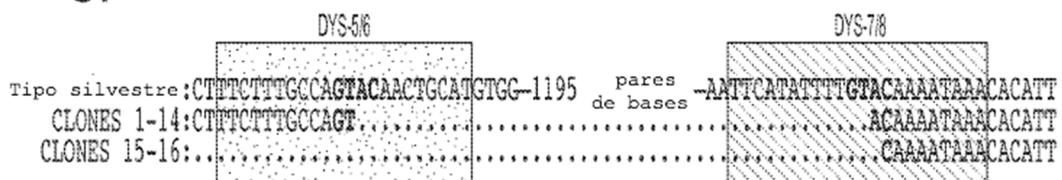
B.**C.**

FIG. 4

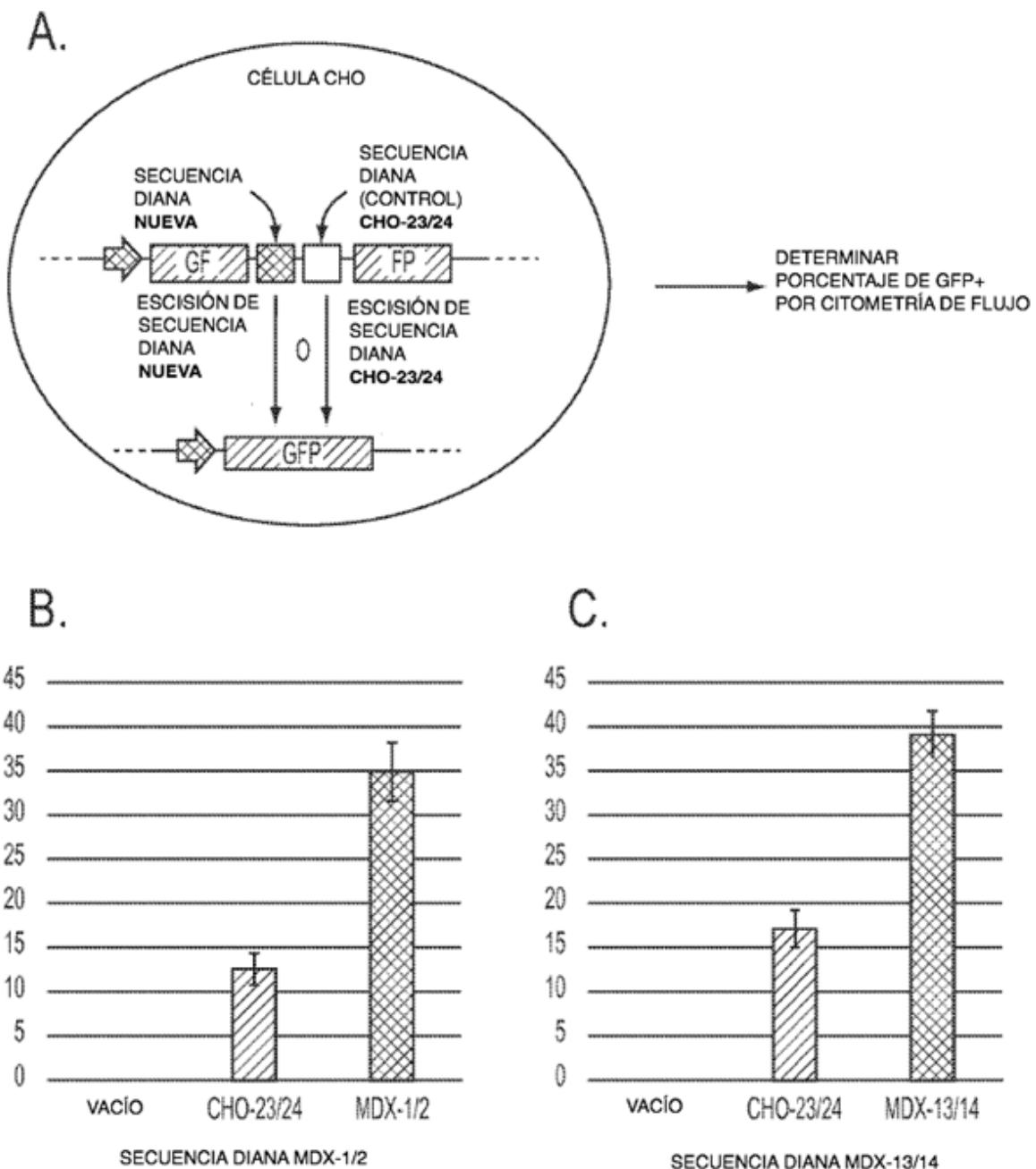


FIG. 5

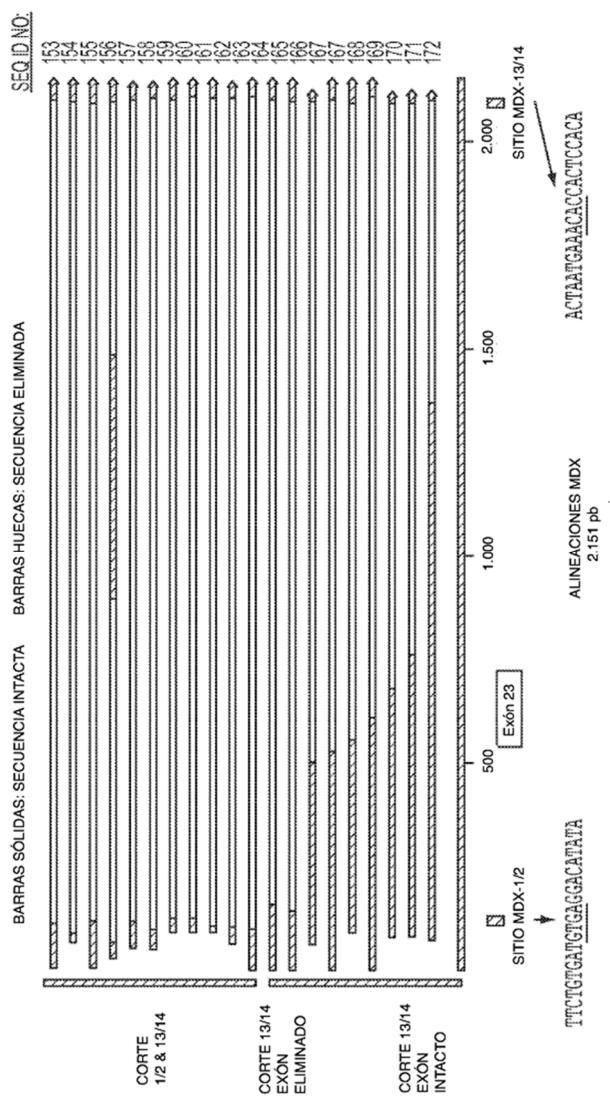


FIG. 6

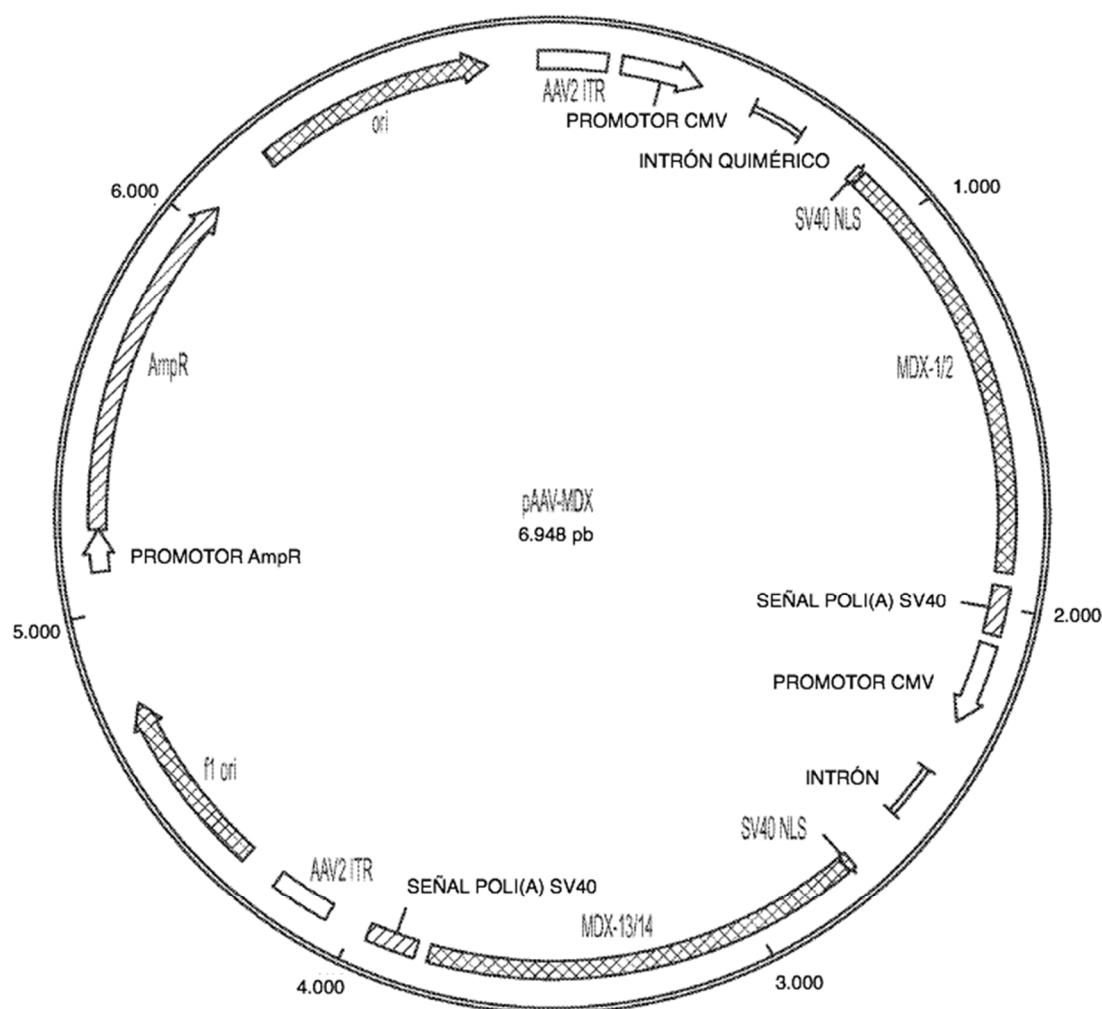


FIG. 7