

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 867 809**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.05.2009 E 17195536 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.03.2021 EP 3284823**

54 Título: **Método para el salto eficaz del exón (44) en la distrofia muscular de Duchenne y medios asociados**

30 Prioridad:

14.05.2008 EP 08156193

15.05.2008 US 128010 P

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

20.10.2021

73 Titular/es:

BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V. (50.0%)

J.H. Oortweg 21

2333 CH Leiden, NL y

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (50.0%)

72 Inventor/es:

PLATENBURG, GERARD JOHANNES;

DE KIMPE, JOSEPHUS JOHANNES;

VAN DEUTEKOM, JUDITH CHRISTINA

THEODORA;

VAN OMMEN, GARRIT-JAN BOUDEWIJN y

AARTSMA-RUS, ANNEMIEKE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 867 809 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

Método para el salto eficaz del exón (44) en la distrofia muscular de Duchenne y medios asociados

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere al campo de la genética, más específicamente la genética humana. La invención en particular se refiere a la modulación del empalme del gen de distrofia muscular de Duchenne humano.

10 **Antecedentes**

Las miopatías son trastornos que suponen una degradación funcional de los músculos. La distrofia muscular (DM) se refiere a enfermedades genéticas que se caracterizan por una debilidad y degeneración progresivas de los músculos esqueléticos. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB) son las formas más comunes en niños de distrofia muscular. Son trastornos recesivos y debido a que el gen responsable de la DMD y la DMB reside en el cromosoma X, las mutaciones principalmente afectan a los varones con una incidencia de aproximadamente 1 de 3500 niños.

La DMD y la DMB son provocadas por defectos genéticos en el gen DMD que codifica distrofina, una proteína muscular que se requiere para las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular para mantener la estabilidad de las fibras musculares durante la contracción. La DMD es un trastorno neuromuscular grave y letal que provoca una dependencia de apoyo en silla de ruedas antes de la edad de 12 y los pacientes de DMD frecuentemente mueren antes de la edad de treinta debido a un fallo respiratorio o cardíaco. En cambio, los pacientes de DMB frecuentemente permanecen ambulatorios hasta más tarde en la vida, y tienen esperanzas de vida casi normales. Las mutaciones de la DMD en el gen de la distrofina se caracterizan por inserciones, deleciones o mutaciones puntuales sin sentido que cambian el marco, dando como resultado la ausencia de distrofina funcional. Las mutaciones de la DMB en general mantienen el marco de lectura intacto, lo que permite la síntesis de una distrofina parcialmente funcional.

Diferentes tratamientos posibles han sido investigados durante los últimos 20 años, entre los que se incluyen trasplante de mioblastos, terapia génica de ADN objetivo y salto del exón mediado por antisentido (van Deutekom y van Ommen, (2003), Nat. Rev. Genet., 4(10):774-83). El salto del exón mediado por antisentido pretende transformar las mutaciones fuera del marco presentes en pacientes de DMD en mutaciones dentro del marco de tipo DMB que dan como resultado la síntesis de una distrofina al menos parcialmente funcional, que prolongará la viabilidad de los músculos (Aartsma-Rus y van Ommen, (2007), RNA, 13(10): 1609-24).

El salto del exón se puede inducir por oligonucleótidos antisentido (OAS) dirigidos contra el sitio donante de empalme o aceptor de empalme de una unión de empalme que se implican en el proceso enzimático de unión del exón, o contra las secuencias internas del exón. En general, los sitios donantes de empalme y aceptores de empalme comprenden secuencias conservadas y determinar estas secuencias tiene el riesgo inevitable de actuar en sitios de empalme de exones adicionales de transcripciones de DMD u otros transcritos de gen.

El exón 44 del gen DMD consiste en 148 pares de bases. El salto terapéutico del exón 44 restauraría el marco de lectura correcto en pacientes de DMD con deleciones que incluyen, pero no se limitan a, los exones 03-43, 05-43, 06-43, 10-43, 13-43, 14-43, 17-43, 19-43, 28-43, 30-43, 31-43, 33-43, 34-43, 35-43, 36-43, 37-43, 38-43, 40-43, 41-43, 42-43, 43, 45, 45-54, y 45-68, o con una duplicación del exón 44. Además, para algunos pacientes de DMD las mutaciones son tales que el salto simultáneo de uno o más exones se requiere además del salto del exón 44 para restaurar el marco de lectura. Ejemplos no limitativos de tales mutaciones son mutaciones puntuales sin sentido en los exones flanqueantes 43 o 45, que requieren el salto de los exones 43+44 o el salto de los exones 44+45 respectivamente. Las mutaciones anteriormente mencionadas en total ocurren en aproximadamente 6-8 % de todos los pacientes de DMD. La mayoría de proteínas de distrofina resultantes serán truncadas en el dominio de la barra central de la proteína, dejando el dominio de unión a actina N-terminal esencial y el dominio C-terminal de unión a distrobrevina y sintrofina, y el dominio rico en cisteína C-terminal de unión a β -distroglicano, intactos.

Descripción

La presente invención identifica cuatro regiones diferentes en el exón 44 que son particularmente adecuadas para inducir el salto del exón 44. La invención describe así un método para modular el empalme del exón 44 del gen DMD en una célula, donde el método comprende la provisión de dicha célula con una molécula que enlaza a una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID N° 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; SEQ ID N° 2: 5'-GGGAACAUGCUAAAUAC, SEQ ID N° 3: 5'-AGACACAAAUUCCUGAGA, o SEQ ID N° 4: 5'-CUGUUGAGAAA. Esta molécula preferiblemente se enlaza o es complementaria a cualquiera de las SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4 cuando las SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4 están presentes en el exón 44 del pre-ARNm de DMD.

En toda la solicitud, la expresión "inducir el salto" es sinónima de "modular el empalme".

65

Se ha observado que una molécula que se enlaza a una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID N° 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; SEQ ID N° 2: 5'-GGGAACAUGC UAAAUAC, SEQ ID N° 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA, o SEQ ID N° 4: 5'-CUGUUGAGAAA produce un salto altamente eficaz del exón 44 en células provistas con esta molécula. Además, ninguna de las secuencias indicadas se deriva de partes conservadas de sitios de unión de empalme. Por lo tanto, no es probable que dicha molécula medie el empalme diferencial de otros exones a partir del pre-ARNm de DMD o exones de otros genes. Además, otra (inmuno)toxicidad se evita preferiblemente evitando pares CpG en la molécula que enlaza a una secuencia de nucleótidos tal y como se ha definido aquí anteriormente.

El salto del exón se refiere a la inducción en una célula de un ARNm maduro que no contiene un exón particular que está normalmente presente en el mismo. El salto del exón se consigue mediante una célula que expresa el pre-ARNm de dicho ARNm, con una molécula capaz de interferir con secuencias tales como, por ejemplo, la secuencia donante de empalme o aceptora de empalme requerida para permitir el proceso enzimático de empalme, o que es capaz de interferir con una señal de inclusión del exón requerida para el reconocimiento de una extensión de nucleótidos como un exón para ser incluido en el ARNm. El término pre-ARNm se refiere a un ARNm precursor no procesado o parcialmente procesado que se sintetiza a partir de una plantilla de ADN en el núcleo celular por transcripción.

Algunos métodos de la divulgación mitigarán una o más características de una célula miogénica o célula muscular de un paciente de DMD con deleciones que incluyen, pero no se limitan a, los exones 03-43, 05-43, 06-43, 10-43, 13-43, 14-43, 17-43, 19-43, 28-43, 30-43, 31-43, 33-43, 34-43, 35-43, 36-43, 37-43, 38-43, 40-43, 41-43, 42-43, 43, 45, 45-54, y 45-68, o con una duplicación del exón 44. Además, la eliminación de un exón flanqueante, tal como, por ejemplo, el exón 43 o el exón 45, debido a una mutación puntual sin sentido en el exón flanqueante, dará lugar a una transcripción fuera del marco. El salto adicional del exón 44, en combinación con el salto del exón flanqueante, restaurará el marco de lectura del gen DMD en células miogénicas o células musculares de pacientes de DMD. Ejemplos no limitativos de tales mutaciones son mutaciones puntuales sin sentido en los exones flanqueantes 43 o 45, que requieren el salto de los exones 43+44 o el salto de los exones 44+45 respectivamente.

En una forma de realización, un método de la divulgación también puede mitigar una o más características de una célula miogénica o célula muscular de un paciente de DMB fuerte, a las características de un paciente de DMB moderado. Las características de una célula de un paciente de DMD o de DMB incluyen absorción de calcio aumentada por las células musculares, síntesis de colágeno aumentada, morfología alterada, biosíntesis de lípidos alterada, estrés oxidativo aumentado, y/o sarcolema dañado. Ejemplos de realización preferidos de un método de la divulgación se definen más adelante en este documento.

En una forma de realización, una molécula tal y como se define aquí puede ser una molécula compuesta que enlaza y/o es complementaria a la secuencia específica, o una proteína tal como una proteína de unión a ARN o una proteína con dedo de zinc no natural que ha sido modificada para ser capaz de enlazar con la secuencia de nucleótidos indicada en una molécula de ARN. Los métodos para cribar moléculas compuestas que enlazan secuencias de nucleótidos específicas son, por ejemplo, descritos en PCT/NL01/00697 y la patente US 6.875.736. Los métodos para diseñar proteínas de dedo de zinc de unión a ARN que enlazan secuencias de nucleótidos específicas son descritos por Friesen y Darby, Nature Structural Biology 5: 543- 546 (1998). La unión a una de las secuencias específicas SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4, preferiblemente en el contexto del exón 44 de DMD se puede evaluar mediante técnicas conocidas por la persona experta. Una técnica preferida es el ensayo de cambio de movilidad de gel como se describe en EP 1 619 249. En una forma de realización preferida, se dice que una molécula enlaza a una de las secuencias específicas tan pronto como una unión de dicha molécula a una secuencia SEQ ID N°: 1, 2, 3 o 4 marcada es detectable en un ensayo de cambio de movilidad de gel. Alternativamente o en combinación con la forma de realización precedente, una molécula es un oligonucleótido que es complementario o sustancialmente complementario a las SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4 o parte de la misma como se dice más adelante en este documento. El término "sustancialmente" complementario usado en este contexto indica que uno o dos o más desapareamientos pueden ser permitidos siempre y cuando la funcionalidad, es decir, la inducción del salto del exón 44, siga siendo aceptable.

La divulgación proporciona un método para diseñar una molécula, preferiblemente un oligonucleótido capaz de inducir el salto del exón 44 del gen DMD. Primero, dicho oligonucleótido se selecciona para enlazar a una de la SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4 o partes de la misma como se ha definido en el presente documento anteriormente. Posteriormente, en un método preferido al menos uno de los siguientes aspectos tiene que ser tomado en cuenta para diseñar y mejorar más dicha molécula:

- La molécula no contiene una CpG,
- La molécula no contiene un motivo de cuarteto de G,
- La molécula tiene propiedades cinéticas y/o termodinámicas de unión a ARN aceptables.

La presencia de una CpG en un oligonucleótido se asocia normalmente a una inmunogenicidad aumentada de dicho oligonucleótido (Dorn y Kippenberger, Curr Opin Mol Ther 2008 10(1) 10-20). Esta inmunogenicidad aumentada no es deseada, ya que puede inducir la descomposición de las fibras musculares. La inmunogenicidad se puede evaluar en un modelo animal mediante evaluación de la presencia de células CD4⁺ y/o CD8⁺ y/o infiltración de mononucleocitos inflamatorios en una biopsia muscular de dicho animal. La inmunogenicidad también se puede evaluar en la sangre

de un animal o de un ser humano tratado con un oligonucleótido de la invención mediante la detección de la presencia de un anticuerpo neutralizante y/o un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido utilizando un inmunoensayo estándar conocido por la persona experta. Un aumento en la inmunogenicidad se puede evaluar mediante la detección de la presencia o de una cantidad en aumento de un anticuerpo neutralizante o un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido utilizando un inmunoensayo estándar.

Un oligonucleótido que comprende un motivo de cuarteto de G tiende a formar un cuádruplex, un multímero o un agregado formado por el apareamiento de bases de Hoogsteen de cuatro oligonucleótidos monocatenarios (Cheng y Van Dyke, Gene. 1997 Sep 15; 197(1-2):253-60), lo que por supuesto no es deseado: como resultado, la eficiencia del oligonucleótido se prevé que disminuya. La multimerización o agregación es preferiblemente evaluada por técnicas de electroforesis en geles no desnaturizantes de poli(acrilamida) estándar conocidas por la persona experta. En una forma de realización preferida, menos del 20 % o 15 %, 10 %, 7 %, 5 % o menos de una cantidad total de un oligonucleótido de la invención tiene la capacidad de multimerizar o agregar con evaluación utilizando el ensayo mencionado anteriormente.

La divulgación permite diseñar un oligonucleótido con propiedades cinéticas y/o termodinámicas de unión a ARN aceptables. Las propiedades cinéticas y/o termodinámicas de unión a ARN son al menos en parte determinadas por la temperatura de fusión de un oligonucleótido (T_m ; calculada con el calculador de propiedades de oligonucleótidos (www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html) para ARN monocatenario que utiliza la T_m básica y el modelo vecino más cercano), y/o la energía libre del complejo del exón determinado de OAS (usando la estructura de ARN versión 4.5). Si una T_m es demasiado alta, se prevé que el oligonucleótido sea menos específico. Una T_m y energía libre aceptables dependen de la secuencia del oligonucleótido. Por lo tanto, resulta difícil dar rangos preferidos para cada uno de estos parámetros. Un T_m aceptable puede oscilar entre 35 y 65 °C y una energía libre aceptable puede oscilar entre 15 y 45 kcal/mol.

La persona experta puede por lo tanto elegir primero un oligonucleótido como un compuesto terapéutico potencial como unión y/o complementario a las SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4 del exón 44 o partes de las mismas tal y como se define aquí. La persona experta puede controlar que dicho oligonucleótido sea capaz de enlazar con dichas secuencias como se ha definido en la presente anteriormente. Opcionalmente en un segundo paso, puede usar la divulgación para optimizar adicionalmente dicho oligonucleótido mediante el control de la ausencia de CpG, la ausencia de un motivo de cuarteto de G, y/o mediante la optimización de su T_m y/o energía libre del complejo objetivo de OAS. Puede intentar diseñar un oligonucleótido donde ninguna CpG y/o ningún motivo de cuarteto de G están presentes y/o donde una T_m y/o energía libre más aceptables se obtienen mediante la elección de una secuencia diferente del exón 44 (por ejemplo, las SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4) a la que el oligonucleótido es complementario. Alternativamente, si un oligonucleótido complementario a una extensión dada dentro de la SEQ ID N°: 1, 2, 3 o 4 del exón 44 comprende una CpG, un motivo de cuarteto de G y/o no tiene una T_m y/o energía libre aceptables, la persona experta puede mejorar cualquiera de estos parámetros disminuyendo la longitud del oligonucleótido, y/o eligiendo una extensión diferente dentro de cualquiera de las SEQ ID N°: 1, 2, 3, o 4 a la que el oligonucleótido es complementario y/o alterando la química del oligonucleótido.

Como ejemplo, al elegir la SEQ ID N°: 1, se diseñaron varios oligonucleótidos y se descubrió que enlazaban esta secuencia: SEQ ID N°: 5, 49, y 54. El oligonucleótido que comprende la SEQ ID N°: 5 se descubrió que tenía propiedades cinéticas y/o termodinámicas de unión a ARN más óptimas, tales como una T_m más óptima. Cuando evaluamos la funcionalidad de estos oligonucleótidos para inducir el salto del exón 44, se confirmó que un oligonucleótido que comprende la SEQ ID N°: 5 es el más eficaz de estos cuatro oligonucleótidos. Cada uno de estos oligonucleótidos es funcional en el sentido de la invención. Sin embargo, un oligonucleótido que comprende la SEQ ID N°: 5 es el oligonucleótido más preferido de la divulgación identificado que enlaza y/o es complementario a la SEQ ID N°: 1.

En cualquier paso del método, un oligonucleótido de la divulgación es preferiblemente un oligonucleótido que sigue siendo capaz de mostrar un nivel aceptable de una actividad funcional. Una actividad funcional de dicho oligonucleótido es preferible para inducir el salto del exón 44 del gen DMD hasta un punto determinado, para proporcionar un individuo con una proteína de distrofina funcional y/o ARNm y/o reducir al menos en parte la producción de una proteína de distrofina aberrante y/o ARNm. Cada una de estas características se define más adelante en este documento. Tal actividad funcional se puede medir en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o *in vitro* en una célula. La evaluación de la funcionalidad se puede realizar en el nivel de ARNm, preferiblemente utilizando RT-PCR. La evaluación de la funcionalidad se puede realizar en el nivel de proteína, preferiblemente utilizando análisis de electrotransferencia o análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales. En una forma de realización preferida, se dice que un oligonucleótido induce el salto del exón 44 de un gen DMD, cuando evaluado en una célula muscular de un paciente de DMD, por RT-PCR, el porcentaje de salto del exón 44 es de al menos 30 %, o al menos 35 %, o al menos 40 %, o al menos 45 %, o al menos 50 %, o al menos 55 %, o al menos 60 %, o al menos 65 %, o al menos 70 %, o al menos 75 %, o al menos 80 %, o al menos 85 %, o al menos 90 %, o al menos 95 %, o 100 %.

En una forma de realización preferida, tal oligonucleótido es preferiblemente un medicamento. Más preferiblemente, dicho medicamento sirve para prevenir o tratar la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia muscular de Becker en

un individuo o un paciente. Tal y como se define aquí un pre-ARNm de DMD significa preferiblemente el pre-ARNm de un gen DMD de un paciente de DMD o de DMB. Un paciente se entiende preferiblemente que significa un paciente con DMD o DMB o un paciente susceptible a desarrollar DMD o DMB debido a su origen genético.

5 En el caso de un paciente de DMD, un oligonucleótido usado preferiblemente corregirá al menos una de las mutaciones de DMD presentes en el gen DMD de dicho paciente y por lo tanto preferiblemente creará una distrofina que se parecerá a una distrofina DMB: dicha distrofina será preferiblemente una distrofina funcional como se define más adelante en este documento.

10 En el caso de un paciente de DMB, un oligonucleótido usado preferiblemente corregirá al menos una de las mutaciones DMB presentes en el gen DMD de dicho paciente y por lo tanto preferiblemente creará una, o más de una, distrofina, que será más funcional que la distrofina que estaba originalmente presente en dicho paciente de DMB. Aún más preferiblemente, dicho medicamento aumenta la producción de una proteína de distrofina funcional o más funcional y/o ARNm y/o reduce al menos en parte la producción de una proteína de distrofina aberrante o menos funcional y/o ARNm en un individuo.

15 Preferiblemente, un método de la divulgación aumenta la producción de una proteína de distrofina más funcional y/o ARNm y/o reduce la producción de una proteína de distrofina aberrante o menos funcional y/o ARNm en un paciente, mediante la inducción y/o la promoción del salto de al menos el exón 44 del pre-ARNm de DMD como se identifica aquí en una o más células, preferiblemente células musculares de dicho paciente. Aumentar la producción de una proteína de distrofina más funcional y/o ARNm y/o disminuir la producción de una proteína de distrofina aberrante y/o ARNm en un paciente se aplica típicamente en un paciente de DMD. Aumentar la producción de una distrofina más

20 funcional o funcional y/o ARNm se aplica típicamente en un paciente de DMB. Por lo tanto, un método preferido es un método, donde en un paciente o en una o más células de dicho paciente, la producción de una proteína de distrofina más funcional o funcional y/o ARNm es aumentada y/o la producción de una proteína de distrofina aberrante y/o ARNm en dicho paciente es disminuida, donde el nivel de dicha proteína de distrofina aberrante o más funcional y/o ARNm se evalúa por comparación en el nivel de dicha distrofina y/o ARNm

25 en dicho paciente en el comienzo del método.

Tal y como se define aquí, una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina de tipo salvaje que corresponde con una proteína con la secuencia de aminoácidos identificada en la SEQ ID N°: 55. Una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina, que tiene un dominio de unión a actina en su parte N terminal (primeros 240 aminoácidos en el N terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácido 3361 hasta 3685) y un dominio C terminal (últimos aminoácidos 325 en el C terminal) donde cada uno de estos dominios están presentes en una distrofina de tipo salvaje como conocido por la persona experta. Los aminoácidos indicados aquí corresponden a aminoácidos de la distrofina de tipo salvaje representada por la SEQ ID N°: 55. En otra forma de realización, una distrofina funcional es una distrofina, que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de una distrofina de tipo salvaje. "Al menos hasta cierto punto" significa preferiblemente al menos 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de una actividad correspondiente de una distrofina funcional de tipo salvaje. En este contexto, una actividad de una distrofina de tipo salvaje es preferiblemente la unión a actina y al complejo de glicoproteína asociada a distrofina (DGC) (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144.). La unión de distrofina a actina y al complejo DGC se puede visualizar mediante coimmunoprecipitación usando extractos totales de proteína o análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales, a partir de una biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico, como conocido por la persona experta. Los individuos que padecen distrofia muscular de Duchenne típicamente tienen una mutación en el gen que codifica la distrofina que impide la síntesis de la proteína completa, es decir una parada prematura impide la síntesis del C-terminal de la proteína. En la distrofia muscular de Becker el gen de distrofina también comprende una mutación en comparación con el tipo salvaje pero la mutación

40 típicamente no incluye una parada prematura y el C-terminal de la proteína es típicamente sintetizado. Como resultado se sintetiza una proteína de distrofina funcional que tiene al menos el mismo tipo de actividad que una proteína de tipo salvaje, aunque no necesariamente la misma cantidad de actividad. En una forma de realización preferida, una proteína de distrofina funcional significa un gen de distrofina en el marco. El genoma de un individuo con DMB codifica típicamente una proteína de distrofina que comprende la parte N terminal (primeros 240 aminoácidos en el N terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácido 3361 hasta 3685) y un dominio C terminal (últimos aminoácidos 325 en el C terminal) pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). Los aminoácidos indicados aquí corresponden a aminoácidos de la distrofina de tipo salvaje representados por la SEQ ID

45 N°: 55. El salto del exón para el tratamiento de DMD es preferiblemente pero no exclusivamente dirigido a superar una parada prematura en el pre-ARNm mediante el salto de un exón en el dominio en forma de barra para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína de distrofina que incluye el C-terminal, aunque la proteína sea algo más pequeña como resultado de un dominio en barra menor. En una forma de realización preferida, un individuo con DMD y que es tratado utilizando un oligonucleótido tal y como se define aquí será previsto con una distrofina, que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de distrofina de tipo salvaje. Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que es un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina comparable en funcionalidad a una distrofina a partir de un individuo que tiene DMB: preferiblemente dicha distrofina es capaz de interactuar con tanto la actina como la DGC, pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm

50 N°: 55. El salto del exón para el tratamiento de DMD es preferiblemente pero no exclusivamente dirigido a superar una parada prematura en el pre-ARNm mediante el salto de un exón en el dominio en forma de barra para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína de distrofina que incluye el C-terminal, aunque la proteína sea algo más pequeña como resultado de un dominio en barra menor. En una forma de realización preferida, un individuo con DMD y que es tratado utilizando un oligonucleótido tal y como se define aquí será previsto con una distrofina, que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de distrofina de tipo salvaje. Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que es un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina comparable en funcionalidad a una distrofina a partir de un individuo que tiene DMB: preferiblemente dicha distrofina es capaz de interactuar con tanto la actina como la DGC, pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm

55 N°: 55. El salto del exón para el tratamiento de DMD es preferiblemente pero no exclusivamente dirigido a superar una parada prematura en el pre-ARNm mediante el salto de un exón en el dominio en forma de barra para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína de distrofina que incluye el C-terminal, aunque la proteína sea algo más pequeña como resultado de un dominio en barra menor. En una forma de realización preferida, un individuo con DMD y que es tratado utilizando un oligonucleótido tal y como se define aquí será previsto con una distrofina, que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de distrofina de tipo salvaje. Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que es un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina comparable en funcionalidad a una distrofina a partir de un individuo que tiene DMB: preferiblemente dicha distrofina es capaz de interactuar con tanto la actina como la DGC, pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm

60 N°: 55. El salto del exón para el tratamiento de DMD es preferiblemente pero no exclusivamente dirigido a superar una parada prematura en el pre-ARNm mediante el salto de un exón en el dominio en forma de barra para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína de distrofina que incluye el C-terminal, aunque la proteína sea algo más pequeña como resultado de un dominio en barra menor. En una forma de realización preferida, un individuo con DMD y que es tratado utilizando un oligonucleótido tal y como se define aquí será previsto con una distrofina, que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de distrofina de tipo salvaje. Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que es un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina comparable en funcionalidad a una distrofina a partir de un individuo que tiene DMB: preferiblemente dicha distrofina es capaz de interactuar con tanto la actina como la DGC, pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm

65 N°: 55. El salto del exón para el tratamiento de DMD es preferiblemente pero no exclusivamente dirigido a superar una parada prematura en el pre-ARNm mediante el salto de un exón en el dominio en forma de barra para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína de distrofina que incluye el C-terminal, aunque la proteína sea algo más pequeña como resultado de un dominio en barra menor. En una forma de realización preferida, un individuo con DMD y que es tratado utilizando un oligonucleótido tal y como se define aquí será previsto con una distrofina, que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de distrofina de tipo salvaje. Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que es un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina comparable en funcionalidad a una distrofina a partir de un individuo que tiene DMB: preferiblemente dicha distrofina es capaz de interactuar con tanto la actina como la DGC, pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm

the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). El dominio en barra central de distrofina de tipo salvaje comprende 24 repeticiones de tipo espectrina (Aartsma-Rus A et al, (2006), Entries in the Leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). Por ejemplo, un dominio en forma de barra central de una distrofina como previsto aquí puede comprender de 5 a 23, de 10 a 22 o de 12 a 18 repeticiones de tipo espectrina siempre y cuando pueda enlazar a actina y a DGC.

Disminuir la producción de una distrofina aberrante en dicho paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel de ARNm y preferiblemente significa que el 99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o menos de la cantidad inicial de ARNm de distrofina aberrante sigue siendo detectable por RT-PCR.

Un ARNm o proteína de distrofina aberrante es también denominado en este caso como un ARNm o proteína de distrofina no funcional o inferior a no funcional o semifuncional. Una distrofina de pre-ARNm no funcional lleva preferiblemente a una proteína de distrofina fuera del marco, lo que significa que ninguna proteína de distrofina será producida y/o detectada. Una proteína de distrofina no funcional es preferiblemente una proteína de distrofina que no es capaz de enlazar actina y/o miembros del complejo de proteína DGC. Una proteína de distrofina o ARNm de distrofina no funcional típicamente no tiene o no codifica una proteína de distrofina con un C-terminal intacto de la proteína.

Aumentar la producción de una distrofina funcional en un paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel de ARNm (mediante análisis RT-PCR) y preferiblemente significa que una cantidad detectable de un ARNm de distrofina funcional o dentro del marco es detectable por RT-PCR. En otra forma de realización, 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del ARNm de distrofina detectable es un ARNm de distrofina funcional o dentro del marco.

Aumentar la producción de una distrofina funcional en un paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel de proteína (mediante análisis de inmunofluorescencia y de electrotransferencia) y preferiblemente significa que una cantidad detectable de una proteína de distrofina funcional es detectable mediante análisis de inmunofluorescencia o de electrotransferencia. En otra forma de realización, 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de la proteína de distrofina detectable es una proteína de distrofina funcional.

Un aumento o una reducción se evalúan preferiblemente en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o un paciente por comparación con la cantidad presente en dicho individuo o paciente antes del tratamiento con dicha molécula o composición de la invención. Alternativamente, la comparación se puede hacer con un tejido muscular o célula de dicho individuo o paciente, que no haya sido aún tratado con dicho oligonucleótido o composición en el caso de que el tratamiento sea local.

En otro aspecto, se describe un método para aliviar uno o más síntomas de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker en un individuo o aliviar una o más características de una célula miogénica o muscular de dicho individuo, donde el método comprende la administración a dicho individuo de un oligonucleótido o una composición tal y como se define aquí.

Además se describe un método para aumentar, inducir o promover el salto de un exón a partir de un pre-ARNm de distrofina en una célula que expresa pre-ARNm en un paciente que padece distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker, donde el método comprende la administración a dicho individuo de un oligonucleótido o una composición tal y como se define aquí.

Además, se describe un método para aumentar la producción de una proteína de distrofina funcional y/o disminuir la producción de una proteína de distrofina aberrante en una célula, donde dicha célula comprende un pre-ARNm de un gen de distrofina que codifica una proteína de distrofina aberrante, donde el método comprende proporcionar a dicha célula un oligonucleótido o composición de la invención y permitir la traducción del ARNm producido a partir del empalme de dicho pre-ARNm. En una forma de realización, dicho método se realiza *in vivo*, por ejemplo, utilizando un cultivo celular. Preferiblemente, dicho método es *in vivo* en dicho individuo.

En este contexto, el aumento de la producción de una proteína de distrofina funcional se ha definido en este documento.

El alivio de uno o más síntomas de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker en un individuo utilizando una molécula o una composición de la invención se puede evaluar mediante cualquiera de los ensayos siguientes: prolongación del tiempo necesario para la pérdida de la capacidad de caminar, mejora de la fuerza muscular, mejora de la capacidad para levantar peso, mejora del tiempo necesario para levantarse del suelo, mejora del tiempo necesario para caminar 9 metros, mejora en el tiempo necesario para subir cuatro escalones, mejora del grado de función de la pierna, mejora de la función pulmonar, mejora de la función cardíaca, mejora de la calidad de vida. Cada uno de estos ensayos son conocidos para la persona experta. Como ejemplo, la publicación de Manzur et al (Manzur AY et al, (2008), Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy (revisión), Wiley publishers, The Cochrane collaboration) da una explicación extensa de cada uno de estos ensayos. Para cada uno de estos ensayos, tan pronto como una mejora o una prolongación de un parámetro medido en un ensayo detectable haya sido descubierta, significará preferiblemente que uno o más síntomas de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker han sido aliviados en un individuo utilizando una molécula o composición de la invención. La mejora o prolongación detectable es preferiblemente una mejora o prolongación significativa estadísticamente

como se describe en Hodgetts et al (Hodgetts S., et al, (2006), Neuromuscular Disorders, 16: 591-602).

Alternativamente, el alivio de uno o más síntomas de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker se puede evaluar mediante la medición de una mejora de una característica de una fibra muscular relacionada con su función, integridad y/o supervivencia, donde dicha característica se evalúa en el propio paciente. Tales características se pueden evaluar en el nivel celular o nivel de tejido de un paciente determinado. Un alivio de una o más características se puede evaluar por cualquiera de los siguientes ensayos en una célula miogénica o célula muscular de un paciente: absorción de calcio reducida por células musculares, síntesis de colágeno disminuida, morfología alterada, biosíntesis de lípidos alterada, estrés oxidativo disminuido, y/o función de fibras musculares mejorada, integridad, y/o supervivencia. Estos parámetros se evalúan normalmente usando análisis de inmunofluorescencia y/o histoquímicos de secciones transversales de biopsias musculares.

Un oligonucleótido como se utiliza en este caso preferiblemente comprende un oligonucleótido antisentido u oligorribonucleótido antisentido. En una forma de realización preferida se aplica una técnica de salto del exón. El salto del exón interfiere con los procesos de empalme natural que ocurren en una célula eucariota. En eucariotas superiores, la información genética para proteínas en el ADN de la célula se codifica en exones que están separados entre sí por secuencias intrónicas. Estos intrones son en algunos casos muy largos. La maquinaria de transcripción de eucariotas genera un pre-ARNm que contiene tanto exones como intrones, mientras que la maquinaria de empalme, frecuentemente ya durante la producción del pre-ARNm, genera la región de codificación real para la proteína empalmado los exones presentes en el pre-ARNm.

El salto del exón produce ARNm maduro que carece de al menos un exón saltado. Así, cuando dicho exón codifica aminoácidos, el salto del exón lleva a la expresión de un producto alterado. La tecnología para el salto del exón se dirige actualmente hacia el uso de oligonucleótidos antisentido (OAS). Mucho de este trabajo se hace en el modelo de ratón *mdx* para distrofia muscular de Duchenne. El ratón *mdx* lleva una mutación sin sentido en el exón 23. A pesar de la mutación de *mdx*, que debería excluir la síntesis de una proteína de distrofina funcional, raras fibras positivas de distrofina de origen natural han sido observadas en el tejido muscular de *mdx*. Se piensa que estas fibras positivas de distrofina han surgido a partir de un mecanismo de salto del exón aparentemente de origen natural, bien debido a mutaciones somáticas o a través de empalme alternativo. Se ha mostrado que OAS dirigidos a, respectivamente, los sitios de empalme 3' y/o 5' de los intrones 22 y 23 en el pre-ARNm de distrofina interfieren con factores normalmente implicados en la eliminación del intrón 23 de modo que también el exón 23 fue quitado del ARNm (Alter J, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. Nat Med 2006;12(2):175-7, Lu QL, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the *mdx* dystrophic mouse. Nat Med 2003;6:6, Lu QL, et al. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. Proc Natl Acad Sci USA 2005;102(1):198-203, Mann CJ, et al, Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the *mdx* mouse model of muscular dystrophy. J Gene Med 2002;4(6):644-54 or Graham IR, et al, Towards a therapeutic inhibition of dystrophin exon 23 splicing in *mdx* mouse muscle induced by antisense oligoribonucleotides (splicomers): target sequence optimisation using oligonucleotide arrays. J Gene Med 2004;6(10):1149-58).

Mediante el salto dirigido de un exón específico, un fenotipo de DMD se convierte en un fenotipo de DMB más suave. El salto de un exón es preferiblemente inducido por la unión de secuencias internas del exón que determinan OAS. Un oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna del exón muestra típicamente ninguna superposición con secuencias sin exón. Preferiblemente no se superpone con los sitios de empalme al menos no siempre y cuando estén presentes en el intrón. Un oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna del exón preferiblemente no contiene una secuencia complementaria a un intrón adyacente. Además, se proporciona así un oligonucleótido según la invención, donde dicho oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, sirve para inhibir la inclusión de un exón de un pre-ARNm de distrofina en el ARNm producido a partir del empalme de dicho pre-ARNm. Una técnica de salto del exón es preferiblemente aplicada de manera que la ausencia de un exón de ARNm producido a partir de pre-ARNm de distrofina genere una región de codificación para una proteína de distrofina más funcional, aunque más corta. En este contexto, inhibir la inclusión de un exón preferiblemente significa que la detección del ARNm de distrofina y/o la proteína original aberrante se reduce como se ha definido en la presente anteriormente.

En el contexto de la invención, un equivalente funcional de un oligonucleótido preferiblemente significa un oligonucleótido tal y como se define aquí donde uno o más nucleótidos han sido sustituidos y donde una actividad de dicho equivalente funcional se retiene hasta al menos un punto determinado. Preferiblemente, una actividad de dicho equivalente funcional está proporcionando una proteína de distrofina funcional. Dicha actividad de dicho equivalente funcional es por lo tanto preferiblemente evaluada mediante la cuantificación de la cantidad de una proteína de distrofina funcional o mediante la cuantificación de la cantidad de un ARNm de distrofina funcional. Una proteína de distrofina funcional (o un ARNm de distrofina funcional) es definido aquí preferiblemente como una proteína de distrofina (o una proteína de distrofina codificada por dicho ARNm) capaz de enlazar actina y miembros de la proteína de DGC. La evaluación de dicha actividad de un oligonucleótido es preferiblemente hecha mediante RT-PCR (ARNm) o mediante análisis de inmunofluorescencia o de electroforesis (proteína). Dicha actividad es preferiblemente retenida hasta al menos un punto determinado cuando representa al menos 50 %, o al menos 60 %, o al menos 70 %, o al menos 80 %, o al menos 90 %, o al menos 95 % o más de la actividad correspondiente de dicho oligonucleótido del

que se deriva el equivalente funcional. Tal actividad se puede medir en un tejido muscular o en una célula muscular de un individuo o *in vitro* en una célula por comparación con una actividad de un oligonucleótido correspondiente de dicho oligonucleótido del que se deriva el equivalente funcional. En toda esta solicitud, cuando la palabra oligonucleótido se usa se puede sustituir por un equivalente funcional del mismo tal y como se define aquí.

5 En una forma de realización preferida, un oligonucleótido de la invención, que comprende una secuencia que enlaza y/o es complementaria a una secuencia del exón 44 de pre-ARNm de distrofina como se ha definido aquí anteriormente, es tal que la parte complementaria es al menos el 50 % de la longitud del oligonucleótido de la invención, más preferiblemente al menos el 60 %, aún más preferiblemente al menos el 70 %, aún más preferiblemente al menos el 80 %, aún más preferiblemente al menos el 90 % o aún más preferiblemente al menos el 95 %, o aún más preferiblemente el 98 % o aún más preferiblemente al menos el 99 %, o aún más preferiblemente el 100 %. En una forma de realización más preferida, un oligonucleótido de la invención consiste en una secuencia que es complementaria a parte del pre-ARNm de distrofina tal y como se define aquí. Como ejemplo, un oligonucleótido puede comprender una secuencia que es complementaria a parte del pre-ARNm de distrofina tal y como se define aquí y a secuencias flanqueantes adicionales. En una forma de realización más preferida, la longitud de dicha parte complementaria de dicho oligonucleótido es de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 nucleótidos. Preferiblemente, secuencias flanqueantes adicionales se utilizan para modificar la unión de una proteína al oligonucleótido, o para modificar una propiedad termodinámica del oligonucleótido, más preferiblemente para modificar la afinidad de enlace a ARN objetivo.

No es por tanto absolutamente requerido que todas las bases en la región de complementariedad sean capaces de aparearse con bases de la cadena opuesta. Por ejemplo, cuando se diseña el oligonucleótido uno puede querer incorporar por ejemplo un residuo que no forma un par de bases con la base de la cadena complementaria. Los desapareamientos pueden, hasta cierto punto, ser permitidos, si bajo las circunstancias en la célula la extensión de los nucleótidos es suficientemente capaz de hibridar con la parte complementaria. En este contexto, "suficientemente" preferiblemente significa que, utilizando un ensayo de cambio de movilidad de gel como se describe en el ejemplo 1 de EP 1 619 249, la unión de un oligonucleótido es detectable. Opcionalmente, dicho oligonucleótido puede ser además evaluado por transfección en células musculares de pacientes. El salto del exón dirigido se puede evaluar por RT-PCR (como se describe en EP 1 619 249). Las regiones complementarias son preferiblemente diseñadas de manera que, cuando se combinan, son específicas para el exón en el pre-ARNm. Tal especificidad se puede crear con varias longitudes de regiones complementarias ya que esto depende de las secuencias reales en otro (pre-)ARNm en el sistema. El riesgo de que también uno o más pre-ARNm diferentes serán capaces de hibridar al oligonucleótido se reduce con el tamaño en aumento del oligonucleótido. Está claro que oligonucleótidos que comprenden desapareamientos en la región de complementariedad pero que retienen la capacidad para hibridar y/o enlazar con la región (las regiones) objetivo en el pre-ARNm se pueden usar en la presente invención. Sin embargo, preferiblemente al menos las partes complementarias no comprenden tales desapareamientos, ya que típicamente tienen una mayor eficiencia y una mayor especificidad que los oligonucleótidos que tienen tales desapareamientos en una o más regiones complementarias. Se piensa que fuerzas de hibridación más altas, (es decir, número de interacciones con la cadena opuesta en aumento) son favorables en el aumento de la eficiencia del proceso de interferencia con la maquinaria de empalme del sistema. Preferiblemente, la complementariedad es entre 90 y 100 %. En general esto permite 1 o 2 desapareamientos en un oligonucleótido de 20 nucleótidos o 1, 2, 3 o 4 desapareamientos en un oligonucleótido de 40 nucleótidos, o 1, 2, 3, 4, 5 o 6 desapareamientos en un oligonucleótido de 60 nucleótidos.

45 Una molécula preferida de la invención comprende o consiste en una secuencia de bases de nucleótidos que es antisentido a una secuencia seleccionada del exón 44 del pre-ARNm de DMD. La secuencia del pre-ARNm de DMD es preferiblemente seleccionada de la SEQ ID N° 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU; SEQ ID N° 2: 5'-GGGAACAUGCUAAUAC, SEQ ID N° 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA, y SEQ ID N° 4: 5'-CUGUUGAGAAA.

50 Una molécula de la invención es preferiblemente una molécula aislada.

Una molécula de la invención es preferiblemente una molécula de ácido nucleico o una molécula con bases de nucleótidos o un oligonucleótido o un oligonucleótido antisentido que se enlaza y/o es complementario a una secuencia del exón 44 seleccionada de la SEQ ID N°: 1, 2, 3 o 4.

55 Una molécula preferida de la invención comprende o consiste en de aproximadamente 8 a aproximadamente 60 nucleótidos, más preferido de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 nucleótidos, más preferido de aproximadamente 17 a aproximadamente 40 nucleótidos, más preferido de aproximadamente 18 a aproximadamente 30 nucleótidos, más preferido de aproximadamente 18 a aproximadamente 24 nucleótidos, de la forma más preferida aproximadamente 20 nucleótidos, tal como 18 nucleótidos, 19 nucleótidos, 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos o 23 nucleótidos.

65 Una molécula preferida de la invención comprende o consiste en de 8 a 60 nucleótidos, más preferido de 10 a 50 nucleótidos, más preferido de 17 a 40 nucleótidos, más preferido de 18 a 30 nucleótidos, más preferido de 21 a 60, más preferido de 22 a 55, más preferido de 23 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido

de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, más preferido de 18 a 24 nucleótidos, o preferiblemente comprende o consiste en 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 nucleótidos.

5 En ejemplos de realización determinados, la invención proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID N° 49 representada en la Tabla 1A.

Una molécula o molécula de ácido nucleico de la invención que enlaza y/o es complementaria y/o es antisentido a un nucleótido que tiene secuencia de nucleótidos: SEQ ID N° 1: 5'-GUGGCUAACAGAAGCU preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEQ ID NO 49; otras moléculas de la divulgación preferiblemente comprenden o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEQ ID N° 5; SEQ ID N° 6, SEQ ID N° 7, SEQ ID N° 8, SEQ ID N° 9, SEQ ID N° 10, SEQ ID N° 11, SEQ ID N° 12, SEQ ID N° 13, SEQ ID N° 14, SEQ ID N° 15, SEQ ID N° 16, SEQ ID N° 17, SEQ ID N° 18, SEQ ID N° 19, SEQ ID N° 20, SEQ ID N° 21, SEQ ID N° 22, SEQ ID N° 23, SEQ ID N° 24, SEQ ID N° 25, SEQ ID N° 26, SEQ ID N° 27, SEQ ID N° 28, SEQ ID N° 29, SEQ ID N° 30, SEQ ID N° 31, SEQ ID N° 32, SEQ ID N° 33, SEQ ID N° 34, SEQ ID N° 35, SEQ ID N° 36, SEQ ID N° 37, SEQ ID N° 38, SEQ ID N°: 39, SEQ ID N°: 41, SEQ ID N°: 42 o SEQ ID N°: 54. Una molécula preferida de la invención que determina esta región del pre-ARNm de DMD comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEQ ID N° 49; moléculas preferidas de la divulgación comprenden o consisten en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N°: 5 o SEQ ID N° 54. El oligonucleótido más preferido de la divulgación comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N°: 5.

En una forma de realización más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consistente en la secuencia de nucleótidos de antisentido SEQ ID N° 5: 5'-UCAGCUUCUGUUAGCCACUG. Se ha observado que esta molécula es muy eficaz en la modulación del empalme del exón 44 del gen DMD en células musculares. Esta molécula preferida de la divulgación que comprende la SEQ ID N°: 5 comprende de 21 a 60, más preferido de 22 a 55, más preferido de 23 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, o preferiblemente comprende o consiste en 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 nucleótidos.

En otra forma de realización preferida, la invención proporciona una molécula que comprende o que consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido SEQ ID N° 49; otra realización preferida de la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido SEQ ID N° 54. Estas moléculas preferidas de la invención o divulgación que comprenden o bien la SEQ ID N°: 49 o bien la SEQ ID N°: 54 comprenden además de 18 a 60, más preferido de 18 a 55, más preferido de 20 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, o preferiblemente comprende o consiste en 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 nucleótidos.

En otra forma de realización, una molécula de la divulgación que es antisentido a la SEQ ID N° 2: 5'-GGGAACAUGC UAAAUAC preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEQ ID N° 43 o SEQ ID N° 44. Estas moléculas preferidas de la divulgación que comprenden o bien la SEQ ID N°: 43 o bien la SEQ ID N°: 44, comprenden además de 17 a 60 nucleótidos, más preferido de 18 a 30 nucleótidos, más preferido de 21 a 60, más preferido de 22 a 55, más preferido de 23 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, más preferido de 18 a 24 nucleótidos, o preferiblemente comprende o consiste en 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 nucleótidos.

En otra forma de realización adicional, una molécula de la divulgación que es antisentido a la SEQ ID N° 3: 5'-AGACACAAAUCCUGAGA preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N° 47 o SEQ ID N° 48. Estas moléculas preferidas de la divulgación que comprenden o bien la SEQ ID N°: 47 o bien la SEQ ID N°: 48 comprenden además de 17 a 60 nucleótidos, más preferido de 18 a 30 nucleótidos, más preferido de 17 a 60, más preferido de 22 a 55, más preferido de 23 a 53, más preferido de 24 a 50, más preferido de 25 a 45, más preferido de 26 a 43, más preferido de 27 a 41, más preferido de 28 a 40, más preferido de 29 a 40, más preferido de 18 a 24 nucleótidos, o preferiblemente comprende o consiste en 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60 nucleótidos.

En otra forma de realización, una molécula de la divulgación que es antisentido a la SEQ ID N° 4: 5'-CUGUUGAGAAA preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N° 45 o la SEQ ID N° 46. Estas moléculas preferidas de la divulgación que comprenden o bien la SEQ ID N°: 45 o bien la SEQ ID N°: 46 comprenden además de 11 a 60 nucleótidos, más preferido de 11 a 30 nucleótidos, más preferido de 11 a 60, o preferiblemente comprenden o consisten en 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, o 60

nucleótidos.

Una secuencia de nucleótidos de una molécula de la invención puede contener residuos de ARN, o uno o más residuos de ADN, y/o uno o más análogos o equivalentes de nucleótido, como será más detallado a continuación en este documento.

Se prefiere que una molécula de la invención comprenda uno o más residuos que se modifican para aumentar la resistencia a nucleasa, y/o para aumentar la afinidad del nucleótido antisentido para la secuencia objetivo. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos antisentido comprende al menos un análogo o equivalente de nucleótido, donde un análogo de nucleótido o equivalente se define como un residuo con una base modificada, y/o un esqueleto modificado, y/o un enlace internucleósido no natural, o una combinación de estas modificaciones.

En una forma de realización preferida, el análogo o equivalente de nucleótido comprende un esqueleto modificado. Ejemplos de tales esqueletos son proporcionados por esqueletos de morfolino, esqueletos de carbamato, esqueletos de siloxano, esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona, esqueletos de formacetilo y tioformacetilo, esqueletos de metilformacetilo, esqueletos de riboacetilo, esqueletos que contienen alqueno, esqueletos de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, esqueletos de metilenoimino y metilhidrazino, y esqueletos de amida. Los oligómeros de morfolino fosfordiamidato son oligonucleótidos de esqueleto modificado que han sido previamente investigados como agentes antisentido. Los oligonucleótidos de morfolino tienen un esqueleto sin carga donde el azúcar de desoxirribosa del ADN se sustituye por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster se sustituye por un enlace fosfordiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parece que funcionan como agentes antisentido mediante detención de la traducción o interferencia con el empalme de pre-ARNm en lugar de mediante la activación de RNasa H. Los oligonucleótidos de morfolino han sido administrados exitosamente a células de cultivo de tejido mediante métodos que físicamente interrumpen la membrana celular, y un estudio que comparaba varios de estos métodos descubrió que la carga por raspadura fue el método más eficaz de administración; sin embargo, debido a que el esqueleto de morfolino está sin carga, los lípidos catiónicos no son mediadores eficaces de la absorción de oligonucleótido de morfolino en las células. Un reciente informe demostró la formación de triples mediante un oligonucleótido de morfolino y, debido al esqueleto no iónico, estos estudios mostraron que el oligonucleótido de morfolino era capaz de formar triples en ausencia de magnesio.

Es más preferido que el enlace entre los residuos en un esqueleto no incluya un átomo de fósforo, tal como un enlace que se forma por enlaces internucleósidos de alquilo de cadena corta o de cicloalquilo, heteroátomo mezclado y enlaces internucleósidos de alquilo o de cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta.

Las moléculas basadas en ácido nucleico de péptido (ANP) (Nielsen, et al. (1991) Science 254, 1497-1500) son reproducciones auténticas de moléculas de ADN en cuanto al reconocimiento de pares de base. El esqueleto del ANP está compuesto de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por enlaces de péptidos, donde las nucleobases se enlazan al esqueleto por enlaces de carbonil metileno. Un esqueleto alternativo comprende un monómero de ANP de pirrolidina extendida con un carbono (Govindaraju y Kumar (2005) Chem. Commun, 495-497). Ya que el esqueleto de una molécula de ANP contiene grupos fosfato no cargados, los híbridos de ANP-ARN son normalmente más estables que los híbridos de ARN-ARN o de ARN-ADN, respectivamente (Egholm et al (1993) Nature 365, 566-568).

Un esqueleto preferido adicional comprende un análogo o equivalente de nucleótido de morfolino, donde el azúcar de ribosa o de desoxirribosa se sustituye por un anillo de morfolino con 6 miembros.

En otra forma de realización adicional, un análogo o equivalente de nucleótido de la invención comprende una sustitución de uno de los oxígenos sin puente en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente el apareamiento de bases, pero añade resistencia significativa a la degradación de nucleasa. Un análogo o equivalente de nucleótido preferido comprende fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, H-fosfonato, fosfonato de metilo y de otro alquilo que incluye 3'-alquilen-fosfato, 5'-alquilen-fosfato y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato que incluye 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato o boranofosfato.

Otro análogo o equivalente de nucleótido preferido adicional de la invención comprende una o más fracciones de azúcar que son mono o disustituidas en la posición 2', 3' y/o 5' tal como un -OH; -F; alquilo, alqueno, alquino, alcarilo, alilo, o aralquilo (C1-C10) inferior sustituido o no sustituido, lineal o ramificado, que se puede interrumpir por uno o más heteroátomos; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S-, o N-alquino; O-, S-, o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; metoxietoxi; -dimetilaminoetoxi; y -dimetilaminoetoxietoxi. La fracción de azúcar puede ser una piranosa o un derivado de la misma, o una desoxipiranosa o un derivado de la misma, preferiblemente ribosa o un derivado de la misma, o desoxirribosa o un derivado de la misma. Una fracción de azúcar derivada preferida es un ácido nucleico bloqueado (ANB), donde el átomo de carbono 2' se enlaza al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando así una fracción de azúcar bicíclica. Un ANB preferido comprende un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-etileno (Morita et al. 2001. Nucleic Acid Res Supplement No. 1: 241-242). Estas sustituciones hacen el

análogo o equivalente de nucleótido resistente a la RNasa H y a la nucleasa y aumentan la afinidad para el ARN objetivo.

5 En otra forma de realización, un análogo o equivalente de nucleótido de la invención comprende una o más modificaciones de base o sustituciones. Las bases modificadas comprenden bases sintéticas y naturales tales como inosina, xantina, hipoxantina y otros derivados -aza, deaza, -hidroxi, -halo, -tio, tiol, -alquilo, -alqueno, -alquino, -alquino, tioalquilo de bases de pirimidina y de purina que son o serán conocidos en la técnica.

10 Se entiende por una persona experta que no es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido antisentido sean modificadas uniformemente. Además, más de uno de los análogos o equivalentes anteriormente mencionados se pueden incorporar en un oligonucleótido antisentido único o incluso en una posición única dentro de un oligonucleótido antisentido. En algunos ejemplos de realización, un oligonucleótido antisentido de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes.

15 Un oligonucleótido antisentido preferido según la invención comprende un oligonucleótido antisentido de 2'-O-alquilfosforotioato, tal como ribosa 2'-O-metil modificada (ARN), ribosa 2'-O-etil modificada, ribosa 2'-O-propil modificada, y/o derivados sustituidos de estas modificaciones tales como derivados halogenados.

20 Un oligonucleótido antisentido más preferido según la invención comprende una ribosa 2'-O-metil-fosforotioato.

También será entendido por una persona experta que diferentes oligonucleótidos antisentido se pueden combinar para saltar eficazmente el exón 44. En una forma de realización preferida, una combinación de al menos dos oligonucleótidos antisentido se usan en un método de la invención, tales como dos oligonucleótidos antisentido diferentes, tres oligonucleótidos antisentido diferentes, cuatro oligonucleótidos antisentido diferentes, o cinco oligonucleótidos antisentido diferentes.

30 Un oligonucleótido antisentido se puede enlazar a una fracción que mejora la absorción del oligonucleótido antisentido en las células, preferiblemente células miogénicas o células musculares. Ejemplos de tales fracciones son colesteroles, carbohidratos, vitaminas, biotina, lípidos, fosfolípidos, péptidos que penetran en la célula que incluyen, pero no se limitan a, Antennapedia, TAT, transportan y aminoácidos positivamente cargados tales como oligoarginina, poliarginina, oligolisina o polilisina, dominios de unión a antígeno tal como proporcionados por un anticuerpo, un fragmento Fab de un anticuerpo, o un dominio de unión a antígeno monocatenario tal como un dominio de unión a antígeno de dominio único de camélido.

35 Un oligonucleótido antisentido preferido comprende un oligómero de morfolino fosforodiamidato (PMO) enlazado a péptido.

40 Un oligonucleótido de la invención se puede administrar indirectamente usando medios adecuados conocidos en la técnica. Un oligonucleótido puede por ejemplo ser proporcionado a un individuo o una célula, tejido u órgano de dicho individuo en forma de un vector de expresión donde el vector de expresión codifica una transcripción que comprende dicho oligonucleótido. El vector de expresión es preferiblemente introducido en una célula, tejido, órgano o individuo vía un vehículo de administración del gen. En una forma de realización preferida, se proporciona un vector de expresión basado en virus que comprende un casete de expresión o un casete de transcripción que conduce expresión o transcripción de una molécula como se identifica en este documento. Una célula puede ser proporcionada con una molécula capaz de interferir con secuencias esenciales que suponen un salto altamente eficaz del exón 44 por expresión de oligonucleótido antisentido derivado de plásmido o expresión vírica proporcionada por vectores basados en adenovirus o en virus adenoasociados. La expresión es preferiblemente conducida por un promotor de polimerasa III, tal como un promotor de ARN U1, U6, o U7. Un vehículo de administración preferido es un vector vírico tal como un vector de 65 virus adenoasociado (VAA), o un vector retroviral tal como un vector de lentivirus (Goyenvalle A, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. Science 2004; 306(5702):1796-9, De Angelis FG, et al. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(14):9456-61 o Denti MA, et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of *mdx* mice. Hum Gene Ther 2006; 17(5):565-74) y similares. También, plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos utilizables para recombinación homóloga dirigida e integración en el genoma humano de células pueden ser adecuadamente aplicados para la administración de un oligonucleótido tal y como se define en este documento. Preferidos para la invención actual son aquellos vectores donde la transcripción es conducida a partir de promotores PolIII, y/o donde las transcripciones son en las fusiones de forma con transcripciones U1 o U7, que producen buenos resultados para la entrega de pequeñas transcripciones. Es competencia del artesano diseñar transcripciones adecuadas. Se prefieren transcripciones conducidas por PolIII. Preferiblemente, en la forma de una transcripción de fusión con una transcripción Ulor U7 (véase de nuevo Goyenvalle A et al, De Angelis FG et al or Denti MA et al). Tales fusiones se pueden generar como se ha descrito (Gorman L, et al, Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95(9):4929-34 or Suter D, et al, Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. Hum Mol Genet 1999; 8(13):2415-

23).

El oligonucleótido se puede administrar como es. Sin embargo, el oligonucleótido también se puede codificar mediante el vector vírico. Típicamente, este está en forma de una transcripción de ARN que comprende la secuencia del oligonucleótido en una parte de la transcripción.

5 Un sistema de expresión de oligonucleótido antisentido preferido es un vector basado en virus asociado a adenovirus (VAA). Los vectores basados en VAA monocatenarios y bicatenarios han sido desarrollados para que se puedan usar para expresión prolongada de pequeñas secuencias de nucleótidos antisentido para un salto altamente eficaz del exón 44 de DMD.

10 Un vector basado en VAA preferido comprende un casete de expresión que se conduce por un promotor de polimerasa III (Pol III). Un promotor Pol III preferido es, por ejemplo, un promotor de ARN U1, U6, o U7.

15 La invención por lo tanto también proporciona un vector basado en virus, que comprende un casete de expresión conducido por promotor Pol III para la expresión de un oligonucleótido antisentido de la invención para inducir el salto del exón 44 del gen DMD.

20 Las mejoras en medios para suministrar a un individuo o una célula, tejido u órgano de dicho individuo un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo se anticipan considerando el progreso que ya se ha conseguido hasta ahora. Tales mejoras futuras pueden por supuesto incorporarse para conseguir el efecto mencionado en la reestructuración del ARNm utilizando un método de la divulgación. Un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo se pueden administrar como son a un individuo, una célula, tejido u órgano de dicho individuo. Cuando se administra un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo, se prefiere que un oligonucleótido y/o un equivalente del mismo esté disuelto en una solución que es compatible con el método de administración. Las células musculares o miogénicas
25 pueden estar previstas con un plásmido para la expresión de oligonucleótido antisentido proporcionando el plásmido en una solución acuosa. Alternativamente, un plásmido se puede proporcionar por transfección usando agentes de transfección conocidos. Para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intraventricular se prefiere que la solución sea una solución salina fisiológica. Particularmente preferido en la invención es el uso de un excipiente o agentes de transfección que ayudará en la administración de cada uno de los constituyentes tal y como se define aquí a una célula y/o en una célula, preferiblemente una célula muscular. Se prefieren excipientes o agentes de transfección capaces de formar complejos, nanopartículas, micelas, vesículas y/o liposomas que administran cada constituyente tal y como se define aquí, en un complejo o retenidos en una vesícula o liposoma a través de una membrana celular. Muchos de estos excipientes se conocen en la técnica. Excipientes adecuados o agentes de transfección comprenden polietilenimina (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) o derivados del mismo, o polímeros catiónicos similares, que incluyen copolímeros de polipropilenimina o polietilenimina (PEC) y derivados, anfifilos sintéticos (SAINT-18), lipofectin™, proteínas cápsidas DOTAP y/o víricas que son capaces de autoensamblarse en partículas que pueden entregar cada constituyente tal y como se define aquí a una célula, preferiblemente una célula muscular. Se ha mostrado que tales excipientes entregan eficazmente un oligonucleótido tal como ácidos nucleicos antisentido a una amplia variedad de células cultivadas, incluidas células musculares. Su alto potencial de transfección se combina con una exceptuada toxicidad de baja a moderada en cuanto a la supervivencia celular global. La facilidad de modificación estructural puede utilizarse para permitir modificaciones adicionales y el análisis de sus características de transferencia de ácido nucleico y toxicidad adicionales (*in vivo*).

45 La lipofectina representa un ejemplo de un agente de transfección liposomal. Consiste en dos componentes lipídicos, un lípido catiónico de cloruro N-[1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (cp. DOTAP que es la sal de metilsulfato) y un lípido neutro de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro media la liberación intracelular. Otro grupo de sistemas de administración son las nanopartículas poliméricas.

50 Los policationes tales como dietilaminoetilaminoetilo (DEAE)-dextrano, que son bien conocidos como reactivos de transfección de ADN, pueden estar combinados con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden entregar cada constituyente tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido a través de membranas celulares en las células.

55 Además de estos materiales de nanopartículas comunes, la protamina de péptido catiónico ofrece un método alternativo para formular un oligonucleótido con coloides. Este sistema de nanopartícula coloidal puede formar los así llamados protículas, que se pueden preparar mediante un proceso de autoensamblaje simple para empaquetar y mediar la liberación intracelular de un oligonucleótido. La persona experta puede seleccionar y adaptar cualquiera de los anteriores u otros excipientes alternativos disponibles comercialmente y los sistemas de entrega para empaquetar y entregar un oligonucleótido para usar en la presente invención para administrarlo para el tratamiento de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker en seres humanos.

65 Además, un oligonucleótido podría estar enlazado de manera covalente o de manera no covalente a un ligando objetivo diseñado específicamente para facilitar la absorción en la célula, citoplasma y/o su núcleo. Tal ligando podría comprender (i) un compuesto (incluidas, pero no limitado a, estructuras de (tipo) péptidos) que reconoce elementos específicos de célula, tejido u órgano que facilitan la absorción celular y/o (ii) un compuesto químico capaz de facilitar

la absorción en las células y/o la liberación intracelular de un oligonucleótido de las vesículas, por ejemplo, endosomas o lisosomas.

5 Por lo tanto, en una forma de realización preferida, un oligonucleótido se formula en una composición o un medicamento o una composición, que dispone de al menos un excipiente y/o un ligando objetivo para la administración y/o un dispositivo de administración del mismo a una célula y/o la mejora de su administración intracelular. Por consiguiente, la invención también abarca una composición farmacéuticamente aceptable que incluye un oligonucleótido y que además comprende al menos un excipiente y/o un ligando objetivo para la administración y/o un dispositivo de administración de dicho oligonucleótido a una célula y/o la mejora de su administración intracelular.

10 Debe entenderse que si una composición comprende un constituyente adicional tal como un compuesto complementario como se define en este documento más adelante, cada constituyente de la composición puede que no sea formulado en una combinación o composición o preparación única. Dependiendo de su identidad, la persona experta conocerá que tipo de formulación es la más apropiada para cada constituyente tal y como se define aquí. En una forma de realización preferida, la invención proporciona una composición o una preparación que está en forma de un conjunto de partes que incluyen un oligonucleótido y un compuesto adjunto adicional como se define más adelante en este documento.

20 Un oligonucleótido preferido sirve para prevenir o tratar la distrofia muscular de Duchenne (DMD) o la distrofia muscular de Becker (DMB) en un individuo. Un individuo, que puede ser tratado utilizando un oligonucleótido de la invención puede ya haber sido diagnosticado con una DMD o una DMB. Alternativamente, un individuo que puede ser tratado utilizando un oligonucleótido de la invención puede que no haya sido aún diagnosticado con una DMD o una DMB, pero puede ser un individuo con un riesgo aumentado de desarrollar una DMD o una DMB en el futuro dado su contexto genético. Un individuo preferido es un ser humano.

25 Si es necesario, una molécula o un vector que expresa un oligonucleótido antisentido de la invención pueden incorporarse en una mezcla farmacéuticamente activa añadiendo un portador farmacéuticamente aceptable.

30 Por lo tanto, la invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una molécula que comprende un oligonucleótido antisentido según la invención, o un vector basado en virus que expresa el oligonucleótido antisentido según la invención.

En otro aspecto, se proporciona una composición que incluye un oligonucleótido tal y como se define aquí. Preferiblemente, dicha composición comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes tal y como se define aquí. Más preferiblemente, estos dos oligonucleótidos distintos se diseñan para saltar uno o dos o más exones. El multisalto está englobado en la presente invención, donde un oligonucleótido de la invención que induce el salto del exón 44 se usa en combinación con otro oligonucleótido que induce el salto de otro exón. En este contexto, otro exón puede ser el exón 43, 45 o 52. El multisalto de exón ha sido ya descrito en EP 1 619 249. El gen DMD es un gen grande, con muchos exones diferentes. Considerando que el gen se localiza en el cromosoma X, afecta mayoritariamente a los niños, aunque las niñas también pueden estar afectadas por la enfermedad, ya que puede recibir una mala copia del gen de ambos padres, o padecer una inactivación particularmente sesgada del alelo funcional debido a una inactivación del cromosoma X particularmente sesgada en sus células musculares. La proteína se codifica por una pluralidad de exones (79) sobre un rango de al menos 2,4 Mb. Defectos pueden ocurrir en cualquier parte del gen DMD. El salto de un exón particular o de exones particulares puede, muy a menudo, suponer un ARNm reestructurado que codifica una proteína de distrofina más corta de lo normal, pero al menos parcialmente funcional. Un problema práctico en el desarrollo de un medicamento basado en tecnología de salto del exón es la pluralidad de mutaciones que pueden suponer una deficiencia en la proteína de distrofina funcional en la célula. A pesar del hecho de que ya múltiples mutaciones diferentes se pueden corregir mediante el salto de un exón único, esta pluralidad de mutaciones requiere la generación de una serie de diferentes fármacos, ya que para mutaciones diferentes se necesita saltar exones diferentes. Una ventaja de un oligonucleótido o de una composición que comprende al menos dos oligonucleótidos diferentes como se define más adelante en este documento capaz de inducir el salto de dos o más exones, es que se pueden saltar más de un exón con un único fármaco. Esta propiedad no solo es prácticamente muy útil en tanto que solo un número limitado de fármacos necesitan ser generados para tratar muchas mutaciones diferentes de DMD o particulares y graves de DMB. Otra opción ahora abierta al experto en la técnica es seleccionar proteínas de distrofina reestructuradas particularmente funcionales y producir compuestos capaces de generar estas proteínas de distrofina preferidas. Tales resultados finales preferidos son además referidos como distrofinas de fenotipo moderado.

60 En una forma de realización preferida, donde dicha composición es preferiblemente una composición farmacéutica, dicha composición farmacéutica comprende un portador, adyuvante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables. También se proporciona que tal composición farmacéutica puede comprender cualquier portador, relleno, conservante, adyuvante, solubilizador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptables. Tal portador, relleno, conservante, adyuvante, solubilizador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable puede por ejemplo encontrarse en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. Cada característica de dicha composición ha sido definida anteriormente aquí.

65 Si diferentes oligonucleótidos son usados, la concentración o la dosis ya definida aquí puede referirse a la

concentración o dosis total de todos oligonucleótidos usados o a la concentración o dosis de cada oligonucleótido usado o adicionado. Por lo tanto, en una forma de realización, se proporciona una composición donde cada cantidad o la cantidad total de oligonucleótido usada se dosifica en una cantidad que oscila entre 0,5 mg/kg y 10 mg/kg.

5 La invención describe además el uso de un oligonucleótido antisentido según la invención, o un vector basado en virus que expresa un oligonucleótido antisentido según la invención, para modular el empalme del ARNm de DMD. El empalme es preferiblemente modulado en células miogénicas humanas o células musculares *in vitro*. Más preferido es que el empalme se module en células miogénicas humanas o células musculares *in vivo*.

10 Un oligonucleótido antisentido preferido que comprende uno o más análogos o equivalentes de nucleótido de la invención modula el empalme en una o más células musculares, incluidas las células de músculo cardíaco, tras la administración sistémica. En este aspecto, la administración sistémica de un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo o equivalente de nucleótido específico puede suponer la determinación de un subconjunto de células de músculo, mientras que un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo o equivalente de nucleótido diferente puede suponer la determinación de un subconjunto diferente de células musculares. Por lo tanto, en una forma de realización se prefiere usar una combinación de oligonucleótidos antisentido que comprende análogos o equivalentes de nucleótido diferentes para modular el salto del exón 44 del ARNm de DMD.

20 La invención además proporciona el uso de un oligonucleótido antisentido según la invención, o de un vector basado en virus que expresa el oligonucleótido antisentido según la invención, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente de DMD o de DMB.

Por lo tanto, en otro aspecto, se proporciona el uso de un oligonucleótido o de una composición tal y como se define aquí para la producción de un medicamento para prevenir o tratar la distrofia muscular de Duchenne o la distrofia muscular de Becker en un individuo. Cada característica de dicho uso ha sido definida anteriormente en este documento.

25 Un tratamiento en un uso según la invención o en un método según la divulgación dura al menos una semana, al menos un mes, al menos varios meses, al menos un año, al menos 2, 3, 4, 5, 6 años o más. Cada molécula u oligonucleótido o equivalente del mismo tal y como se define aquí para el uso según la invención se puede adecuar para la administración directa a una célula, un tejido y/o un órgano *in vivo* de individuos afectados o en riesgo de desarrollar DMD o DMB, y se puede administrar directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La frecuencia de administración de un oligonucleótido, composición, compuesto o compuesto adjunto de la invención puede depender de diferentes parámetros tales como la edad del paciente, la mutación del paciente, el número de moléculas (es decir, la dosis), la formulación de dicha molécula. La frecuencia puede oscilar entre al menos una vez en dos semanas, o tres semanas, o cuatro semanas, o cinco semanas o un período de tiempo más largo.

30 Los rangos de dosis de oligonucleótido según la invención son preferiblemente diseñados basándose en estudios de dosis creciente en pruebas clínicas (uso *in vivo*) para los que existen requisitos de protocolo rigurosos. Una molécula o un oligonucleótido tal y como se define aquí se puede usar con una dosis que oscila entre 0,1 y 20 mg/kg, preferiblemente 0,5 y 10 mg/kg.

40 En una forma de realización preferida, se usa una concentración de un oligonucleótido tal y como se define aquí, que oscila entre 0,1 nM y 1 μ M. Preferiblemente, este rango es para uso *in vitro* en un modelo celular tal como células musculares o tejido muscular. Más preferiblemente, la concentración usada oscila entre 0,3 y 400 nM, aún más preferiblemente entre 1 y 200 nM. Si diferentes oligonucleótidos son usados, esta concentración o dosis puede referirse a la concentración o dosis total de oligonucleótidos o a la concentración o dosis de cada oligonucleótido adicionado. Los rangos de concentración o dosis de oligonucleótido(s) como determinadas anteriormente son concentraciones o dosis preferidas para usos *in vitro* o *ex vivo*. La persona experta entenderá que dependiendo del oligonucleótido (los nucleótidos) usado(s), la célula objetivo que debe tratarse, el gen objetivo y sus niveles de expresión, el medio usado y las condiciones de transfección e incubación, la concentración o dosis del oligonucleótido (los nucleótidos) usado(s) puede variar más y puede necesitar ser más optimizada.

50 Un oligonucleótido tal y como se define aquí para el uso según la invención se puede adecuar para la administración a una célula, un tejido y/o un órgano *in vivo* de individuos afectados por o en riesgo de desarrollar DMD o DMB, y se puede administrar *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Dicho oligonucleótido puede ser directa o indirectamente administrado a una célula, un tejido y/o un órgano *in vivo* de un individuo afectado por o en riesgo de desarrollar DMD o DMB, y se puede administrar directa o indirectamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Como las distrofias musculares de Duchenne y de Becker tienen un fenotipo pronunciado en células musculares, se prefiere que dichas células sean células musculares, se prefiere más que dicho tejido sea un tejido muscular y/o se prefiere más que dicho órgano comprenda o consista en un tejido muscular. Un órgano preferido es el corazón. Preferiblemente, dichas células comprenden un gen que codifica una proteína de distrofina mutante. Preferiblemente, dichas células son células de un individuo que padece DMD o DMB.

60 A menos que se indique lo contrario, cada forma de realización como se describe en este documento se puede combinar con otra forma de realización como se describe en este documento.

65 En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los artículos después de la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados

específicamente no son excluidos. Además, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en" y significa que un compuesto o compuesto adjunto tal y como se define aquí puede comprender componente(s) adicional(es) al (a los) que se identifican específicamente, donde dicho(s) componente(s) adicional(es) no altera(n) la característica única de la invención.

5 Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad que más de una unidad del elemento estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que allí sea uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa por tanto normalmente "al menos uno".

10 La palabra "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10, alrededor de 10) preferiblemente significa que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos el 1 % del valor.

15 La expresión "in vivo" como se utiliza en este caso puede significar en un sistema celular que puede ser aislado del organismo del que se derivan las células. Las células preferidas son células musculares. *In vivo* también puede significar en un tejido o en un organismo multicelular que es preferiblemente un paciente tal y como se define aquí. En toda la invención, *in vivo* es opuesto a *in vitro*, que es generalmente asociado con un sistema libre celular.

20 Cada forma de realización como se identifica aquí se pueden combinar a menos que se indique lo contrario.

La invención se explica con más detalle en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el ámbito de la invención, sino que sirven meramente para clarificar la invención.

Leyendas de las figuras

25 **Figura 1.** Evaluación de OAS diseñados para inducir el salto del exón 44 a partir del gen DMD en células musculares transfectadas a partir de un control sano o un paciente de DMD con una delección del exón 45.

30 **(A)** En células musculares diferenciadas (miotubos) de un paciente con una delección del exón 45, todos los OAS (transfectados) evaluados indujeron el salto del exón 44 en una concentración de 150 nM, con PS188 (SEQ ID N°: 5), PS190 (publicado previamente como h44ONA2; Aartsma-Rus et al. *Neuromuscul Disord* 2002; 12 Suppl: S71), PS191 (SEQ ID N°: 47), PS193 (SEQ ID N°: 48), PS194 (SEQ ID N°: 46), y PS196 (SEQ ID N°: 51) demostrando rendimientos máximos (entre 84 % y 94 %).

35 **(B)** La mayoría de OAS fueron también evaluados por transfección en las células de control de humano sano en concentraciones de 150 y 400 nM. Los resultados se resumen en este gráfico de columna. Se confirmó que PS188 (SEQ ID N°: 5), PS190, PS191 (SEQ ID N°: 47), PS193 (SEQ ID N°: 48), PS194 (SEQ ID N°: 46), y PS196 (SEQ ID N°: 51) eran más eficaces en la inducción del salto del exón 44. Debe tenerse en cuenta que los niveles del salto del exón 44 en las células de los pacientes son típicamente superiores que en las células de control como resultado del hecho de que, a diferencia de células sanas, en las células de los pacientes el salto del exón 44 es restaurador del marco y da lugar a un marco más funcional y estable. Ningún salto del exón 44 fue observado en las células musculares no transfectadas en todos experimentos (datos no mostrados).

40 **(C)** Ejemplos de PS197 (SEQ ID N° 52) y tres OAS adicionales, PS199 (SEQ ID N° 44), PS200 (SEQ ID N° 49), y PS201 (SEQ ID N° 50), evaluados de forma similar en las células musculares de control, en concentraciones de transfección de 150 nM y 400 nM. Los porcentajes de salto del exón 44 variaron entre 1 % (PS199) y 44 % (PS200). M: marcador de tamaño de ADN (escalera de 100 pb).

50 **Figura 2.** Evaluación adicional del PS188 (SEQ ID N°: 5) mediante transfección de células musculares de control humano o células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

(A) Experimento de respuesta a la dosis. En las células musculares de control humano, PS188 mostró niveles crecientes de salto del exón 44 en dosis de transfección en aumento de 50 nM a 400 nM (*in triplo*), hasta 45 % a 400 nM.

55 **(B)** PBMC de un individuo sano fueron transfectadas con 200 nM de PS188. A pesar del hecho de que la distrofina solo se expresa en niveles bajos en este tipo de células, el salto del exón 44 fue observado claramente. Estos resultados confirman la eficiencia del PS188 en la inducción del salto del exón 44 del gen DMD. M: marcador de tamaño de ADN.

60 **Figura 3.** Evaluación adicional del PS188 (SEQ ID N°: 5) mediante administración a ratones transgénicos con DMDh que expresan la longitud total del gen DMD humano, y a monos *Cynomolgus* incluidos en estudios de toxicidad extensivos.

65 **(A)** Después de la inyección intramuscular de 2x40 µg de PS188 en ambos músculos gastrocnemios (G1 y G2) de un ratón con DMDh, el salto del exón 44 fue observado, aunque en niveles bajos. Esto confirma la capacidad del PS188 para inducir el salto del exón 44 humano en el tejido muscular *in vivo*. Los niveles bajos fueron

previstos dado el hecho de que este modelo de ratón tiene fibras musculares sanas que típicamente muestran niveles inferiores de absorción de OAS en comparación con las fibras musculares distróficas. NT: en músculos con DMDh no tratados no se observó salto del exón 44. M: marcador de tamaño de ADN

(B) En monos incluidos en estudios de toxicidad en PS188, el salto del exón 44 fue observado en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) después de infusiones intravenosas de 1 hora cada cuarto día durante 29 días con un nivel de dosis de 6 mg/kg de PS188. No se observó salto del exón 44 en monos no tratados (NT). M: marcador de tamaño de ADN.

Ejemplos

Ejemplo 1

Material y métodos

El diseño de OAS fue basado en estructuras secundarias abiertas que se superponen (parcialmente) del ARN del exón objetivo como predicho por el programa mfold (Mathewset al., J Mol Biol 1999,288(5): 911-40), en sitios de unión de proteína SR putativos que se superponen (parcialmente) como predicho por el software ESE-finder (rulai.cshl.edu/tools/ESE/) (Cartegni et al., Nucleic Acids Res 2003; 31(13): 3568-71), y en evitar extensiones de g de 3 o más nucleótidos o pares de CpG. OAS (véase la Tabla 1) fueron sintetizados por Eurogentec (Bélgica) y Prosensa Therapeutics BV (Leiden, Países Bajos), y contienen ARN de 2'-O-metil y esqueletos de fosforotioato de longitud total.

Cultivo de tejido, transfección y análisis RT-PCR

Los cultivos de miotubos derivados a partir de un individuo sano ("control humano") o un paciente de DMD con una delección del exón 45 fueron procesados como se ha descrito previamente (Aartsma-Rus et al. Hum Mol Genet 2003; 12(8): 907-14; Havenga et al. J Virol 2002; 76(9): 4612-20). Para el cribado de OAS, cultivos de miotubo fueron transfectados con 150 y/o 400 nM de cada OAS. El reactivo de transfección polietilenimina (PEI, ExGen500 MBI Fermentas) o un derivado (UNIFectylin, Prosensa Therapeutics BV, Países Bajos) fue usado, con 2 µl de ExGen500 o UNIFectylin por µg de OAS. Un OAS de control con una marca de fluoresceína fue usado para confirmar los rendimientos de transfección óptimos (típicamente más del 90 % de núcleos fluorescentes fueron obtenidos). ARN fue aislado de 24 a 48 horas después de la transfección como se ha descrito (Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002,12 Suppl: S71). Los rendimientos del salto del exón fueron determinados por análisis RT-PCR anidados usando cebadores en los exones flanqueantes del exón 44 (Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002,12 Suppl: S71). Los fragmentos PCR fueron aislados de geles de agarosa (utilizando el equipo QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) para la verificación de secuencias (por el Leiden Genome Technology Center (LGTC) utilizando el equipo BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems), y el secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems). Para cuantificación, los productos PCR fueron analizados utilizando el equipo DNA 1000 LabChips en el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE.UU.).

Resultados

Una serie de secuencias objetivo de OAS en el exón 44 fueron diseñadas y evaluadas tanto en control sano como en cultivos de miotubos derivados de pacientes, mediante transfección y el análisis RT-PCR y de secuencias posterior del ARN aislado. En miotubos derivados de un paciente de DMD con una delección del exón 45, el salto del exón 44 específico fue inducido a 150 nM para cada OAS (PS187 a PS201) evaluado, con PS188 (SEQ ID N°: 5), PS190 (publicado previamente como h44ONA2, Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002; 12 Suppl: S71), PS191 (SEQ ID N°: 47), POS193 (SEQ ID N°: 48), PS194 (SEQ ID N°: 46), y PS196 (SEQ ID N°: 51) demostrando niveles máximos de salto (entre 84 % y 94 % a 150 nM) (Fig. 1A).

Experimentos de transfección similares fueron hechos en las células de control a partir de un individuo sano. Los porcentajes de salto del exón 44 fueron evaluados y comparados con los de los cultivos de células de los pacientes (Fig. 1B). Inherentes al deterioro del ARN mediado sin sentido de la transcripción de control después del salto del exón 44, los porcentajes de control fueron típicamente inferiores a los de las células de los pacientes (véase por ejemplo los resultados con PS197 en la fig. 1A (células de los pacientes) vs la fig. 1C (células de control)).

Tres OAS adicionales (PS199 (SEQ ID N° 44), PS200 (SEQ ID N° 49), y PS201 (SEQ ID N° 50)) fueron evaluados en las células musculares de control, en concentraciones de 150 nM y 400 nM. Los porcentajes de salto del exón 44 variaron entre 1 % (PS199) y 44 % (PS200) (Fig. 1C). Basado en todos los experimentos de transfección, los OAS PS187, PS188, PS190, PS191, PS192, PS193, PS194, PS196 y PS200 fueron considerados los más eficaces, y OAS PS189, PS197, PS198, PS199, y PS201 los menos eficaces.

PS188 (SEQ ID N° 5) fue evaluado adicionalmente en experimentos de respuesta a la dosis en células musculares de control humano sanas, aplicando dosis en aumento de 50 a 400 nM *in triplo*. Niveles en aumento de salto del exón 44 fueron por consiguiente observados, hasta 45 % a 400 nM de PS188 (figura 2A).

Ejemplo 2 – ejemplo comparativo

Materiales y métodos

5 Una muestra de sangre de control de humano sano fresca, recogida en un tubo de EDTA, fue estratificada encima de un gradiente de HistoPaque. Tras la centrifugación, la segunda capa (de las cuatro capas, de arriba a abajo) con las células mononucleares fue recogida, lavada y centrifugada nuevamente. El granulato celular fue resuspendido en el medio de cultivo de proliferación y contado. En una placa de 6 pocillos, 8×10^6 células por pocillo fueron colocadas en la placa e incubadas a 37 °C, 5 % CO₂ durante 3 h. Las células fueron luego transfectadas con 0 o 200 nM de PS188 (SEQ ID N°: 5, ARN 2'OMePS; Prosensa Therapeutics BV), *in duplo*, por placa. El ARN fue aislado 72 h después de la transfección y analizado por análisis RT-PCR usando cebadores específicos del gen de DMD flanqueantes del exón 44 (Aartsma-Rus et al. Neuromuscul Disord 2002,12 Suppl: S71). El análisis de secuencias (por el Leiden Genome Technology Center (LGTC) utilizando el equipo BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems), y el secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems) fue realizado en productos PCR aislados (utilizando el equipo QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN) para confirmar el salto del exón 44 específico en el nivel del ARN.

Resultados

20 En las células mononucleares de sangre periférica transfectadas (PBMC) de un individuo de control sano, el PS188 indujo la producción de un nuevo fragmento de transcripción más corto cuando se aplica a 200 nM (Fig. 2B). Este fragmento fue aislado y secuenciado y confirmado debido al salto específico del exón 44. En PBMC no transfectadas no se observó salto del exón 44. Estos resultados indican que el PS188 es un compuesto eficaz que induce el salto del exón 44 humano *in vitro*.

Ejemplo 3 – ejemplo comparativo

Materiales y métodos

Oligorribonucleótidos antisentido (OAS).

30 [0095] Ratones normales y *mdx* (Sicinski et al. (1989). Science 244: 1578-1580) fueron inyectados con el m46ONA4 específico de ratón (van Deutekom et al. (2001) Hum Mol Genet 10: 1547-1554), mientras que los ratones con DMDh con el PS196 específico humano (SEQ ID N° 51) o PS188 (SEQ ID N° 5). Ambos OAS contenían un esqueleto de fosforotioato de longitud total y moléculas de ribosa modificadas 2'-O-metil (PS196: Eurogentec, Bélgica; PS188: Prosensa Therapeutics BV).

Ratones normales, *mdx* y transgénicos con DMDh

40 Ratones normales (C57Bl/6NCrL) y ratones *mdx* (C57Bl/10ScSn-*mdx*/J) fueron obtenidos de Charles River Laboratories (Países Bajos). Ratones transgénicos con DMDh fueron diseñados en nuestros propios laboratorios de LUMC. Brevemente, células madre embrionarias (ES) fueron modificadas genéticamente a través de fusiones con esferoplastos de levadura con un YAC de 2,7 Mb que contenía el gen DMD humano en toda su longitud (2,4 Mb). Este YAC fue reconstruido previamente por recombinación homóloga de YAC más pequeños que se superponen en la levadura (Den Dunnen et al. (1992). Hum Mol Genet 1: 19-28). Las células ES que muestran la integración de una copia del YAC del tamaño completo, como evaluado por mapeo por PFGE, análisis de PCR de exón a través del gen entero, y análisis FISH de metafase, fueron entonces usadas para generar ratones con DMDh homocigóticos (t Hoen et al., J. Biol. Chem. 2008). Los ratones transgénicos con DMDh no parecen ser afectados físicamente por la modificación genética. La expresión apropiada del gen DMD humano podría ser demostrada en el músculo, tanto en el nivel de ARN como en el nivel de proteína. La ingeniería de estos ratones fue autorizada por el Ministerio Holandés de Agricultura (LNV); proyecto n° VVA/BD01.284 (E21).

Administración de OAS.

55 Los experimentos en inyecciones de OAS intramuscular en ratones fueron autorizados por la comisión experimental animal (UDEC) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Leiden (proyecto n° 00095, 03027). OAS fueron inyectados, bien puros, o bien en un compuesto a la polietilimina de polímero catiónico (PEI; ExGen 500 (20x), MBI Fermentas) en proporciones de 1 ml de PEI por nmol de OAS en una solución de glucosa de 5 % p/v, o a 15 nmol de SAINT-18TM (Synvolux Therapeutics B.V., Países Bajos), según las instrucciones de los fabricantes. El sistema de administración SAINT-18TM se basa en un grupo de cabeza de piridinio catiónico y permite la administración no tóxica de oligonucleótidos antisentido. Los ratones fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de una solución 1:1 (v/v) de Hypnorm/Dormicum (Janssen Pharmaceutica, Belgium/Roche, Países Bajos). El OAS puro (PS188) fue administrado en un volumen de inyección final de 40 µl por inyección intramuscular en ambos músculos gastrocnemios de los ratones utilizando una jeringa Hamilton jeringa con una aguja de calibre 22. Los ratones recibieron dos inyecciones de 40 µg en un intervalo de 24 h. Fueron sacrificados en diferentes puntos de tiempo después de la inyección; para los ratones con DMDh inyectados con PS188 diez días después de la última inyección. Los músculos

fueron aislados y congelados en 2-metilbutano enfriado con nitrógeno líquido.

Análisis RT-PCR.

- 5 Las muestras musculares fueron homogeneizadas en la solución de ARN de abeja (Campro Scientific, Países Bajos). El ARN total fue aislado y purificado según las instrucciones del fabricante. Para síntesis de ADNc con la polimerasa de *C. therm* de transcriptasa inversa o transcriptor (Roche Diagnostics, Países Bajos), 300 ng de ARN fue usado en una reacción de 20 µl a 60°C durante 30 min, cebado inverso con cebadores específicos de ratón o de humano. Los primeros PCR fueron realizados con conjuntos de cebador externos (exones flanqueantes 43-45 para ratones inyectados con PS188), durante 20 ciclos de 94 °C (40 seg), 60 °C (40 seg), y 72 °C (60 seg). Un µl de esta reacción (diluida 1:10) fue luego reamplificada utilizando combinaciones de cebador anidado en los exones que flanquean directamente el exón objetivo (exón 44 para los ratones inyectados con PS188), con 30 ciclos de 94 °C (40 seg), 60 °C (40 seg), y 72 °C (60 seg). Los productos PCR fueron analizados en 2 % de geles de agarosa. Los rendimientos de salto fueron determinados por cuantificación de productos PCR utilizando el equipo DAN 1000 LabChip® y el bioanalizador de Agilent 2100 (Agilent Technologies, Países Bajos). Conjuntos de cebador y secuencias fueron descritos previamente (Aartsma-Rus et al. (2002) *Neuromuscul Disord* 12 Suppl: S71.8,17; van Deutekom et al. (2001) *Hum Mol Genet* 10: 1547-1554).

Análisis de secuencias.

- 20 Los productos de RT-PCR fueron aislados de 2 % de geles de agarosa utilizando el equipo QIAquick Gel Extraction (QUIAGEN). Secuenciación directa del ADN directa se efectuó por el Leiden Genome Technology Center (LGTC) utilizando el equipo BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems), y se analizó en un secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems).

- 25 Espectrometría de masas MALDI-TOF.

- 30 Los homogenizados musculares de ARN de abeja fueron purificados utilizando un equipo de purificación de ácido nucleico (equipo de purificación de ácido nucleico para equipo Sequazyme™ Pinpoint SNP, Applied Biosystems) con placas giratorias con 96 pocillos (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. La solución matricial (50 mg/ml ácido 3-hidroxipicolínico y 25 mM citrato de amonio dibásico en 50 % de acetonitrilo) fue aplicada en alícuotas de 1 ml para un objetivo de muestra de AnchorChip™ (Bruker Daltonics, Alemania) y aire seco. Muestras fueron detectadas en alícuotas de 0,5 ml sobre los cristales matriciales y aire seco. Determinaciones de masa fueron realizadas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF Reflex III (Bruker Daltonics, Alemania). Espectros fueron adquiridos en modo reflector y acumulados durante aproximadamente 900 disparos láser. Muestras de m46ONA4 marcadas y no marcadas fueron analizadas para comparación.

Resultados

- 40 Salto del exón en el músculo de tipo salvaje

- Primero configuramos el salto del exón objetivo en músculos de ratones *in vivo* y parámetros diferentes optimizados de administración. Experimentos iniciales fueron realizados en ratones de tipo salvaje, y, aunque el deterioro de ARN mediado sin sentido provocará la subestimación de los rendimientos de salto del exón, el efecto de los OAS fue monitoreado solo en el nivel de ARNm. Inyectamos dosificaciones en aumento de 0,9 nmol a 5,4 nmol de cada oligonucleótido antisentido. El análisis RT-PCR de ARN muscular total demostró la ocurrencia de un nuevo fragmento de transcripción más corto en todas las muestras inyectadas. El análisis de secuencias confirmó el salto preciso del exón 44 en este producto (datos no mostrados).

- 50 Secciones transversales de los músculos inyectados contralaterales fueron analizadas para dispersión y persistencia de un OAS de control marcado con fluoresceína. Después de la inyección de OAS puro, observamos señales fluorescentes en algunas fibras durante hasta una semana. En un momento posterior solo señales débiles eran observadas, y principalmente en los espacios intersticiales. El uso de PEI claramente mejoró tanto la dispersión como la persistencia de la señal fluorescente, incluso después de 3 semanas. Sin embargo, también indujo degeneración fibrosa e infiltración de monocito que absorbía la mayoría de la fluorescencia. Utilizando SAINT, la mayor parte de la señal fue detectada en los espacios intersticiales durante hasta una semana, lo que indica que este reactivo no administra eficazmente el OAS en las fibras musculares. Ya que la señal fluorescente puede no corresponder a la presencia de OAS intactos y funcionales, realizamos espectrometría de masas MALDI-TOF de muestras musculares inyectadas. Los análisis indicaron que la marca fluorescente fue quitada del OAS en 24 horas. El OAS marcado fue detectable solo durante hasta dos semanas cuando se usaba PEI. Los OAS intersticiales fueron probablemente más vulnerables a la degradación que los OAS intracelulares. El OAS no marcado fue observado durante tres a cuatro semanas después de la inyección en todas las tres series, pero puede ser solo funcional cuando está presente intracelularmente, es decir en la serie de PEI.

- 65 Salto del exón específico humano en músculo DMDh

Ya que la estrategia de salto del exón es un método terapéutico específico de secuencia, la validación preclínica ideal sería un gen DMD humano objetivo, en un contexto experimental con ratones. Hemos diseñado tales ratones con DMD "humanizados" (DMDh) transgénicos que llevan una copia integrada y funcional del gen DMD humano en toda su longitud. La expresión de distrofina humana en músculo de ratón con DMDh fue específicamente detectada por análisis inmunohistoquímico de secciones transversales, utilizando un anticuerpo específico de humano (MANDYS106). En el nivel de ARN muscular, análisis RT-PCR usando cebadores específicos de ratón o de humano demostraron la transcripción correcta del gen DMD humano. Además, tras el cruce con ratones *mdx*, el constructo DMDh mostró que complementa el defecto distrófico, como fue evaluado mediante análisis histológico y de microarray de ADNc (t Hoen et al., J. Biol. Chem. 2008). Ratones con DMDh tienen fibras musculares sanas que típicamente exhiben una absorción limitada de OAS puros. Inyectamos el OAS específico de humano PS196 (SEQ ID N° 51) en un complejo a PEI, o PS188 (SEQ ID N° 5) sin PEI, en los músculos gastrocnemios de ratones con DMDh (inyecciones de 2x40 µg en 24 h). De 7 a 10 días después de la inyección observamos claramente el salto del exón 44 objetivo de la transcripción de DMD humano (Fig. 3A). Aunque los OAS específicos de humano son altamente homólogos a las secuencias de ratón correspondientes, con solo 2 o 3 desapareamientos en los respectivos 20 meros, las transcripciones endógenas de ratón no eran afectadas en ningún nivel detectable. El PS188 indujo salto del exón 44, como confirmado por el análisis de secuencias. No se observó salto del exón 44 en un músculo DMDh no tratado. Estos resultados indican que el PS188 es un compuesto eficaz que induce el salto del exón 44 humano en el tejido muscular.

Ejemplo 4 – ejemplo comparativo

Material y métodos

Como parte de un programa de toxicidad extensivo para PS188, monos *Cynomolgus* sin ayunar fueron tratados por infusión intravenosa de 1 hora (5 mL/kg/h) cada cuatro días durante 29 días con un nivel de dosis de 6 mg/kg de PS188 (SEQ ID N° 5; ARN 2'OMePS; Agilent Life Sciences, EE.UU.). Las formulaciones de PS188 fueron recientemente preparadas en cada día del tratamiento (en los días de prueba 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25 y 29) poco antes de iniciar la administración (lo más antes posible, a lo sumo dentro de una hora antes de iniciar la administración). Las formulaciones fueron preparadas por disolución de PS188 en el tampón fosfato; la pureza y el contenido de agua se tomaron en cuenta como previstas en el certificado de análisis de la sustancia farmacológica. La cantidad de PS188 fue ajustada al peso corporal actual de cada animal. Los animales fueron sacrificados 96 horas después de la última administración (día 33). Las muestras de sangre (10 ml) fueron recogidas en tubos de EDTA, y (después de la carga durante toda la noche a temperatura ambiente) estratificadas encima de un gradiente de HistoPaque. Tras la centrifugación, la segunda capa (de las cuatro capas, de arriba a abajo) con las células mononucleares fue recogida, lavada y centrifugada nuevamente. ARN fue aislado del granulado celular resultante y analizado mediante análisis RT-PCR usando cebadores específicos del gen DMD que flanquean el exón 44 (Aartsma-Rus et al. *Neuromuscul Disord* 2002,12 Suppl: S71). El análisis de secuencias (por el Leiden Genome Technology Center (LGTC) utilizando el equipo BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Applied Biosystems), y el secuenciador ABI 3700 (PE Applied Biosystems) fue realizado en productos PCR aislados (utilizando el equipo QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) para confirmar el salto del exón 44 específico en el nivel de ARN.

Resultados

En monos tratados con infusiones intravenosas de 1 hora cada cuatro días durante 29 días en el nivel de dosis de 6 mg/kg de PS188, el salto del exón 44 fue observado en las células mononucleares de sangre periférica (Fig. 3B), a pesar del hecho de que estas células expresan solo niveles bajos de distrofina. La secuencia de DMD de humano y de mono objetivo del PS188 es de hecho es 100 % idéntica. No se observó salto del exón 44 en monos no tratados. Estos resultados indican que el PS188 es un compuesto eficaz que induce el salto del exón 44 *in vivo*.

Tabla 1 Secuencias de oligonucleótido antisentido.

Tabla 1A

1 (PS188)	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEQ ID N° 5	Comparativo
2	UUCAGCUUCUGUUAGCCACU	SEQ ID N° 6	Comparativo
3	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEQ ID N° 7	Comparativo
4	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N° 8	Comparativo
5	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N° 9	Comparativo
6	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N° 10	Comparativo
7	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N° 11	Comparativo
8	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEQ ID N° 12	Comparativo
9	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEQ ID N° 13	Comparativo
10	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N° 14	Comparativo
11	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N° 15	Comparativo

ES 2 867 809 T3

12	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N° 16	Comparativo
13	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUA	SEQ ID N° 17	Comparativo
14	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N° 18	Comparativo
15	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N° 19	Comparativo
16	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 20	Comparativo
17	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 21	Comparativo
18	CAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEQ ID N° 22	Comparativo
19	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEQ ID N° 23	Comparativo
20	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N° 24	Comparativo
21	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N° 25	Comparativo
22	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N° 26	Comparativo
23	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N° 27	Comparativo
24	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N° 28	Comparativo
25	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N° 29	Comparativo
26	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 30	Comparativo
27	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 31	Comparativo
28	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 32	Comparativo

(continuación)

29	AGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEQ ID N° 33	Comparativo
30	GCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N° 34	Comparativo
31	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N° 35	Comparativo
32	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N° 36	Comparativo
33	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N° 37	Comparativo
34	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N° 38	Comparativo
35	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N° 39	Comparativo
36	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 40	Comparativo
37	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 41	Comparativo
38	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 42	Comparativo
39 (PS 192)	CCAUUUGUAUUUAGCAUGUCC	SEQ ID N° 43	Comparativo
40 (PS 199)	AGAUACCAUUUGUAUUUAGC	SEQ ID N° 44	Comparativo
41 (PS 187)	GCCAUUUCUCAACAGAUCU	SEQ ID N° 45	Comparativo
42 (PS 194)	GCCAUUUCUCAACAGAUCUGUCA	SEQ ID N° 46	Comparativo
43 (PS 191)	AUUCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC	SEQ ID N° 47	Comparativo
44 (PS 193)	UCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC	SEQ ID N° 48	Comparativo
45 (PS 200)	GUUCAGCUUCUGUUAGCC	SEQ ID N° 49	De la invención
46 (PS 201)	CUGAUUAAAUAUCUUUAU C	SEQ ID N° 50	Comparativo

Tabla 1B

47 (PS196)	GCCGCCAUUUCUCAACAG	SEQ ID N° 51	Comparativo
48 (PS 197)	GUAUUUAGCAUGUCCCA	SEQ ID N° 52	Comparativo
49 (PS 198)	CAGGAAUUUGUGUCUUUC	SEQ ID N° 53	Comparativo
50 (PS189)	UCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N° 54	Comparativo

5 SEQ ID N°: 55 secuencia de aminoácidos DMD de homo sapiens

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRLLDLLEGLTG
QKLPKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNI GSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQ
VKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTTSWSDGLALNALIHSHRPDL
FDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQ
VSIEAIQEVEMLPRPPKVTKEEHFQLHHQM HYSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQ
AAYVTTSDPTRSPFPSQHLEAPEDKSFSSLMSEVNLD RYQTAL EEVLSWLLSAEDTLQA
QGEISNDVEVVKDQFH THEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLS EDEETEVEEQM
NLLNSRWECLRVASMEKQSNLHRVLM DLQNLKELNDWLT KTEERTRKMEEEPLGPD L
EDLKRQVQQHKVLQEDLEQEVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQLKVLGDRWAN
ICRWTE DRWVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQK
LAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKNKSVTQKTEAWLDNFARCDNLVQKLEKS
TAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVT TREQILVKHAQEE LPPPPQKKRQITVDSEIRKRL
DVDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEKVN AIEREKA EKFRKLQDASRSAQA
LVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIIAFYNQLQQL EQMT
TTAENWLKIQPTTTPSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGQGPMLDA
DFVAFTNHFKQVFSVDVQAREKELQTFIDTLPPMRYQETMSAIRTWVQQSETKLSIPQLSVT
DYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEEIEGRWKK
LSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHITLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEILKKQLKQC
RLLVSDIQTIQPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEAL
KGGLEKTVSLQKDLSEMH EWMTQAE EYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKE
AKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLT TNYQWLCTRLNGKCKTLEEVWACWHEL
LSYLEKANKWLNEVEFKLKT TENIPGGAEI SEVLD SLENLMRHS EDNPNQIRILAQT LTD
GGVMDELINEELETFNSRWRELHEEAVRRQK LLEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLA
AYIADKVDAAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKHNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDV
SMKFR LFQK PANFEQRLQESKMILDEVKMHLPAL ETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKLSLSE
VKSEVEMVIKTGRQIVQKKQ TENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQQL EKCLKLSR
KMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRS AVEGMP SNLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITE
VGEALKTVLGKKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAE EWLNLLLEYQKHMETF DQNVDHITK
WIIQADTLLDESEK KKPQKEDVLKRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLV
EPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFN SDIQK LLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKD
MNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEIS
HQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGL
SEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTE DMPL EISYVP
STYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLC AKDFEDL FKQEE SLKNIKDSLQSSGRIDIH SKKT
AALQSATPVERVKLQEALSQ LDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQW
LTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYK WYLKELQDGIGQRQT VVRTLNATGEEIIQSSKTDASIL
QEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEE QKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLPGK
EQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENK LKQTNLQWI
KVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFD
VQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLQL ELRAKQP
DLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
LLDQVIKSQRVMVGDLEDINEMI KQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEART
IITDRIERIQNQWDEVQEHLQNR RQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKE
GPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINAS

WRSIHKRVSEREAAL EETHRLLQQFPLDLEKFLAWL TEAETTANVLQDATRKERLLEDSKG
 VKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSSEL
 RKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQLKDDLSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHR
 AFKRELKTKEPVIMSTLETVRIFL TEQPLEGLEKLYQEPREL PPEERAQNVTRLLRQAEV
 NTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEATDEL DLKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSL
 QDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLLQVAVE
 DRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGPWERAI SPNKVPYYINHETQTTCWDHPKMTELY
 QSLADLNNVRFSA YRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINC
 LTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGHISLCKAHLEDK
 YRYLFKQVASSTGFCDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIE
 AALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVAAAETA KHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQ
 SCFFSGRVAKGHKMHPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKNKFR TKRYFAKHPRMGYLPV
 QTVLEGDNMETPVT LINFWPVDSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLND
 ISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEER GELERILADLEENRNLQ
 AEYDRLKQQHEHKGLSPLSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRL EARMQILED
 HNKQLESQ LHRRLQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRS DSSQPMLLRVVGSTSDSMGE
 EDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> BioMarin Technologies B.V.
Academisch Ziekenhuis Leiden
- <120> Método para salto eficaz del exón (44) en la distrofia muscular de Duchenne y medios asociados
- 10 <130> P6027668EP2
- <150> EP08156193
- <151> 14-05--2008
- 15 <150> US 61/128.010
- <151> 15-05-2008
- <150> PCT/NL2009/050258
- <151> 14-05-2009
- 20 <150> EP09746807.8
- <151> 14-05-2009
- <150> EP14179979.1
- 25 <151> 14-05-2009
- <160> 55
- <170> PatentIn versión 3.3
- 30 <210> 1
- <211> 16
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 1
- guggcuaaca gaagcu** 16
- 40 <210> 2
- <211> 17
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 45 <400> 2
- gggaacaugc uaaauac** 17

	<210> 3 <211> 18 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 3 agacacaaaau uccugaga	18
10	<210> 4 <211> 11 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 4 cuguugagaa a	11
20	<210> 5 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> OAS <400> 5 ucagcuucug uuagccacug	20
30	<210> 6 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> OAS <400> 6 uucagcuucu guuagccacu	20
40	<210> 7 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> OAS <400> 7 uucagcuucu guuagccacu g	21
50	<210> 8 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> OAS <400> 8 ucagcuucug uuagccacug a	21
60	<210> 9 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	

	<220> <223> OAS	
5	<400> 9 uucagcuucu guuagccacu ga	22
10	<210> 10 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> OAS <400> 10 ucagcuucug uuagccacug a	21
20	<210> 11 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> OAS <400> 11 uucagcuucu guuagccacu ga	22
30	<210> 12 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> OAS <400> 12 ucagcuucug uuagccacug au	22
40	<210> 13 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> OAS <400> 13 uucagcuucu guuagccacu gau	23
50	<210> 14 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> OAS <400> 14 ucagcuucug uuagccacug auu	23
60	<210> 15	

	<211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
5	<220> <223> OAS	
	<400> 15 uucagcuucu guuagccacu gauu	24
10	<210> 16 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
15	<220> <223> OAS	
20	<400> 16 ucagcuucug uuagccacug auua	24
25	<210> 17 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
	<220> <223> OAS	
30	<400> 17 uucagcuucu guuagccacu gaua	24
35	<210> 18 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> OAS	
40	<400> 18 ucagcuucug uuagccacug auuaa	25
45	<210> 19 <211> 26 <212> ARN <213> Artificial	
50	<220> <223> OAS	
	<400> 19 uucagcuucu guuagccacu gauuaa	26
55	<210> 20 <211> 26 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220> <223> OAS	
	<400> 20 ucagcuucug uuagccacug auuaaa	26

<210> 21
 <211> 27
 <212> ARN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> OAS

 10 <400> 21
uucagcuucu guuagccacu gauuaaa 27

 <210> 22
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> OAS

 20 <400> 22
cagcuucugu uagccacug 19

 <210> 23
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> OAS

 30 <400> 23
cagcuucugu uagccacuga u 21

 35 <210> 24
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> OAS

 <400> 24
 45 **agcuucuguu agccacugau u** 21

 <210> 25
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

 50 <220>
 <223> OAS

 <400> 25
 55 **cagcuucugu uagccacuga uu** 22

 <210> 26
 <211> 22
 <212> ARN
 60 <213> Artificial

 <220>
 <223> OAS

	<400> 26 agcuucuguu agccacugau ua	22
5	<210> 27 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> OAS	
	<400> 27 cagcuucugu uagccacuga uua	23
15	<210> 28 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
20	<220> <223> OAS	
	<400> 28 agcuucuguu agccacugau uaa	23
25	<210> 29 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
30	<220> <223> OAS	
	<400> 29 cagcuucugu uagccacuga uuaa	24
35	<210> 30 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> OAS	
	<400> 30 agcuucuguu agccacugau uaaa	24
45	<210> 31 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
50	<220> <223> OAS	
	<400> 31 cagcuucugu uagccacuga uuaaa	25
55	<210> 32 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
60	<220>	

	<223> OAS	
	<400> 32	
5	agcuucuguu agccacugau uaaa	24
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ARN	
10	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> OAS	
	<400> 33	
15	agcuucuguu agccacugau	20
	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ARN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> OAS	
25	<400> 34	
	gcuucuguua gccacugauu	20
	<210> 35	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> OAS	
35	<400> 35	
	agcuucuguu agccacugau u	21
	<210> 36	
40	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> OAS	
	<400> 36	
	gcuucuguua gccacugauu a	21
50	<210> 37	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> OAS	
	<400> 37	
60	agcuucuguu agccacugau ua	22
	<210> 38	
	<211> 22	
	<212> ARN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> OAS	
5	<400> 38 gcuucuguua gccacugau aa	22
	<210> 39	
10	<211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
	<220>	
15	<223> OAS	
	<400> 39 agcuucuguu agccacugau uaa	23
	<210> 40	
20	<211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
	<220>	
25	<223> OAS	
	<400> 40 gcuucuguua gccacugau aaa	23
30	<210> 41 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220>	
	<223> OAS	
	<400> 41 agcuucuguu agccacugau uaaa	24
40	<210> 42 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220>	
	<223> OAS	
50	<400> 42 gcuucuguua gccacugau aaa	23
	<210> 43 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220>	
	<223> OAS	
60	<400> 43 ccaauuguau uuagcauguu ccc	23

5	<210> 44 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> OAS	
10	<400> 44 agauaccuu uguauuuagc	20
15	<210> 45 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> OAS	
20	<400> 45 gccauuucuc aacagaucu	19
25	<210> 46 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> OAS	
30	<400> 46 gccauuucuc aacagaucug uca	23
35	<210> 47 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> OAS	
40	<400> 47 auucucagga auuugugucu uuc	23
45	<210> 48 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> OAS	
50	<400> 48 ucucaggaau uuugugucuuu c	21
55	<210> 49 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial <220> <223> OAS	
60	<400> 49	

	guucagcuuc uguuagcc	18
	<210> 50 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
5		
	<220> <223> OAS	
10		
	<400> 50 cugauuuuuuu auuuuuuuuu c	21
	<210> 51 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
15		
	<220> <223> OAS	
20		
	<400> 51 gccgccuuuu cucaacag	18
25		
	<210> 52 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
30		
	<220> <223> OAS	
	<400> 52 guuuuuuuagca uguuccca	18
35		
	<210> 53 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
40		
	<220> <223> OAS	
	<400> 53 caggaauuuug uguuuuuu	18
45		
	<210> 54 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
50		
	<220> <223> OAS	
	<400> 54 ucuuuuuuagcc acuuuuuuuu u	21
55		
	<210> 55 <211> 3685 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i>	
60		
	<400> 55	

ES 2 867 809 T3

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val
1 5 10 15

Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe
20 25 30

Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg
35 40 45

Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys
50 55 60

Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn Asn Val Asn Lys Ala
65 70 75 80

Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp Leu Val Asn Ile Gly Ser

ES 2 867 809 T3

					85						90					95
Thr	Asp	Ile	Val	Asp	Gly	Asn	His	Lys	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Ile	Trp	
			100					105					110			
Asn	Ile	Ile	Leu	His	Trp	Gln	Val	Lys	Asn	Val	Met	Lys	Asn	Ile	Met	
			115				120					125				
Ala	Gly	Leu	Gln	Gln	Thr	Asn	Ser	Glu	Lys	Ile	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	
	130					135					140					
Arg	Gln	Ser	Thr	Arg	Asn	Tyr	Pro	Gln	Val	Asn	Val	Ile	Asn	Phe	Thr	
145					150					155					160	
Thr	Ser	Trp	Ser	Asp	Gly	Leu	Ala	Leu	Asn	Ala	Leu	Ile	His	Ser	His	
				165					170					175		
Arg	Pro	Asp	Leu	Phe	Asp	Trp	Asn	Ser	Val	Val	Cys	Gln	Gln	Ser	Ala	
			180					185					190			
Thr	Gln	Arg	Leu	Glu	His	Ala	Phe	Asn	Ile	Ala	Arg	Tyr	Gln	Leu	Gly	
		195					200					205				
Ile	Glu	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Glu	Asp	Val	Asp	Thr	Thr	Tyr	Pro	Asp	
	210					215					220					
Lys	Lys	Ser	Ile	Leu	Met	Tyr	Ile	Thr	Ser	Leu	Phe	Gln	Val	Leu	Pro	
225					230					235					240	
Gln	Gln	Val	Ser	Ile	Glu	Ala	Ile	Gln	Glu	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Arg	
				245					250					255		
Pro	Pro	Lys	Val	Thr	Lys	Glu	Glu	His	Phe	Gln	Leu	His	His	Gln	Met	
			260					265						270		
His	Tyr	Ser	Gln	Gln	Ile	Thr	Val	Ser	Leu	Ala	Gln	Gly	Tyr	Glu	Arg	
		275					280					285				
Thr	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Arg	Phe	Lys	Ser	Tyr	Ala	Tyr	Thr	Gln	Ala	
	290					295					300					
Ala	Tyr	Val	Thr	Thr	Ser	Asp	Pro	Thr	Arg	Ser	Pro	Phe	Pro	Ser	Gln	
305					310					315					320	
His	Leu	Glu	Ala	Pro	Glu	Asp	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Ser	Leu	Met	Glu	
				325					330					335		

ES 2 867 809 T3

Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu
340 345 350

Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile
355 360 365

Ser Asn Asp Val Glu Val Val Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly
370 375 380

Tyr Met Met Asp Leu Thr Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu
385 390 395 400

Gln Leu Gly Ser Lys Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu
405 410 415

Glu Thr Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu
420 425 430

Cys Leu Arg Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val
435 440 445

Leu Met Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu
450 455 460

Thr Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly
465 470 475 480

Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val Leu
485 490 495

Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu Thr His
500 505 510

Met Val Val Val Val Asp Glu Ser Ser Gly Asp His Ala Thr Ala Ala
515 520 525

Leu Glu Glu Gln Leu Lys Val Leu Gly Asp Arg Trp Ala Asn Ile Cys
530 535 540

Arg Trp Thr Glu Asp Arg Trp Val Leu Leu Gln Asp Ile Leu Leu Lys
545 550 555 560

Trp Gln Arg Leu Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Ala Trp Leu Ser
565 570 575

Glu Lys Glu Asp Ala Val Asn Lys Ile His Thr Thr Gly Phe Lys Asp
580 585 590

ES 2 867 809 T3

Gln Asn Glu Met Leu Ser Ser Leu Gln Lys Leu Ala Val Leu Lys Ala
 595 600 605

Asp Leu Glu Lys Lys Lys Gln Ser Met Gly Lys Leu Tyr Ser Leu Lys
 610 615 620

Gln Asp Leu Leu Ser Thr Leu Lys Asn Lys Ser Val Thr Gln Lys Thr
 625 630 635 640

Glu Ala Trp Leu Asp Asn Phe Ala Arg Cys Trp Asp Asn Leu Val Gln
 645 650 655

Lys Leu Glu Lys Ser Thr Ala Gln Ile Ser Gln Ala Val Thr Thr Thr
 660 665 670

Gln Pro Ser Leu Thr Gln Thr Thr Val Met Glu Thr Val Thr Thr Val
 675 680 685

Thr Thr Arg Glu Gln Ile Leu Val Lys His Ala Gln Glu Glu Leu Pro
 690 695 700

Pro Pro Pro Pro Gln Lys Lys Arg Gln Ile Thr Val Asp Ser Glu Ile
 705 710 715 720

Arg Lys Arg Leu Asp Val Asp Ile Thr Glu Leu His Ser Trp Ile Thr
 725 730 735

Arg Ser Glu Ala Val Leu Gln Ser Pro Glu Phe Ala Ile Phe Arg Lys
 740 745 750

Glu Gly Asn Phe Ser Asp Leu Lys Glu Lys Val Asn Ala Ile Glu Arg
 755 760 765

Glu Lys Ala Glu Lys Phe Arg Lys Leu Gln Asp Ala Ser Arg Ser Ala
 770 775 780

Gln Ala Leu Val Glu Gln Met Val Asn Glu Gly Val Asn Ala Asp Ser
 785 790 795 800

Ile Lys Gln Ala Ser Glu Gln Leu Asn Ser Arg Trp Ile Glu Phe Cys
 805 810 815

Gln Leu Leu Ser Glu Arg Leu Asn Trp Leu Glu Tyr Gln Asn Asn Ile
 820 825 830

Ile Ala Phe Tyr Asn Gln Leu Gln Gln Leu Glu Gln Met Thr Thr Thr
 835 840 845

ES 2 867 809 T3

Ala Glu Asn Trp Leu Lys Ile Gln Pro Thr Thr Pro Ser Glu Pro Thr
850 855 860

Ala Ile Lys Ser Gln Leu Lys Ile Cys Lys Asp Glu Val Asn Arg Leu
865 870 875 880

Ser Gly Leu Gln Pro Gln Ile Glu Arg Leu Lys Ile Gln Ser Ile Ala
885 890 895

Leu Lys Glu Lys Gly Gln Gly Pro Met Phe Leu Asp Ala Asp Phe Val
900 905 910

Ala Phe Thr Asn His Phe Lys Gln Val Phe Ser Asp Val Gln Ala Arg
915 920 925

Glu Lys Glu Leu Gln Thr Ile Phe Asp Thr Leu Pro Pro Met Arg Tyr
930 935 940

Gln Glu Thr Met Ser Ala Ile Arg Thr Trp Val Gln Gln Ser Glu Thr
945 950 955 960

Lys Leu Ser Ile Pro Gln Leu Ser Val Thr Asp Tyr Glu Ile Met Glu
965 970 975

Gln Arg Leu Gly Glu Leu Gln Ala Leu Gln Ser Ser Leu Gln Glu Gln
980 985 990

Gln Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu Ser Thr Thr Val Lys Glu Met Ser Lys
995 1000 1005

Lys Ala Pro Ser Glu Ile Ser Arg Lys Tyr Gln Ser Glu Phe Glu
1010 1015 1020

Glu Ile Glu Gly Arg Trp Lys Lys Leu Ser Ser Gln Leu Val Glu
1025 1030 1035

His Cys Gln Lys Leu Glu Glu Gln Met Asn Lys Leu Arg Lys Ile
1040 1045 1050

Gln Asn His Ile Gln Thr Leu Lys Lys Trp Met Ala Glu Val Asp
1055 1060 1065

Val Phe Leu Lys Glu Glu Trp Pro Ala Leu Gly Asp Ser Glu Ile
1070 1075 1080

Leu Lys Lys Gln Leu Lys Gln Cys Arg Leu Leu Val Ser Asp Ile

ES 2 867 809 T3

1085						1090						1095			
Gln Thr	Ile Gln	Pro Ser	Leu	Asn Ser	Val Asn	Glu	Gly Gly	Gln							
1100			1105			1110									
Lys Ile	Lys Asn	Glu Ala	Glu	Pro Glu	Phe Ala	Ser	Arg Leu	Glu							
1115			1120			1125									
Thr Glu	Leu Lys	Glu Leu	Asn	Thr Gln	Trp Asp	His	Met Cys	Gln							
1130			1135			1140									
Gln Val	Tyr Ala	Arg Lys	Glu	Ala Leu	Lys Gly	Gly	Leu Glu	Lys							
1145			1150			1155									
Thr Val	Ser Leu	Gln Lys	Asp	Leu Ser	Glu Met	His	Glu Trp	Met							
1160			1165			1170									
Thr Gln	Ala Glu	Glu Glu	Tyr	Leu Glu	Arg Asp	Phe	Glu Tyr	Lys							
1175			1180			1185									
Thr Pro	Asp Glu	Leu Gln	Lys	Ala Val	Glu Glu	Met	Lys Arg	Ala							
1190			1195			1200									
Lys Glu	Glu Ala	Gln Gln	Lys	Glu Ala	Lys Val	Lys	Leu Leu	Thr							
1205			1210			1215									
Glu Ser	Val Asn	Ser Val	Ile	Ala Gln	Ala Pro	Pro	Val Ala	Gln							
1220			1225			1230									
Glu Ala	Leu Lys	Lys Glu	Leu	Glu Thr	Leu Thr	Thr	Asn Tyr	Gln							
1235			1240			1245									
Trp Leu	Cys Thr	Arg Leu	Asn	Gly Lys	Cys Lys	Thr	Leu Glu	Glu							
1250			1255			1260									
Val Trp	Ala Cys	Trp His	Glu	Leu Leu	Ser Tyr	Leu	Glu Lys	Ala							
1265			1270			1275									
Asn Lys	Trp Leu	Asn Glu	Val	Glu Phe	Lys Leu	Lys	Thr Thr	Glu							
1280			1285			1290									
Asn Ile	Pro Gly	Gly Ala	Glu	Glu Ile	Ser Glu	Val	Leu Asp	Ser							
1295			1300			1305									
Leu Glu	Asn Leu	Met Arg	His	Ser Glu	Asp Asn	Pro	Asn Gln	Ile							
1310			1315			1320									

ES 2 867 809 T3

Arg Ile Leu Ala Gln Thr Leu Thr Asp Gly Gly Val Met Asp Glu
1325 1330 1335

Leu Ile Asn Glu Glu Leu Glu Thr Phe Asn Ser Arg Trp Arg Glu
1340 1345 1350

Leu His Glu Glu Ala Val Arg Arg Gln Lys Leu Leu Glu Gln Ser
1355 1360 1365

Ile Gln Ser Ala Gln Glu Thr Glu Lys Ser Leu His Leu Ile Gln
1370 1375 1380

Glu Ser Leu Thr Phe Ile Asp Lys Gln Leu Ala Ala Tyr Ile Ala
1385 1390 1395

Asp Lys Val Asp Ala Ala Gln Met Pro Gln Glu Ala Gln Lys Ile
1400 1405 1410

Gln Ser Asp Leu Thr Ser His Glu Ile Ser Leu Glu Glu Met Lys
1415 1420 1425

Lys His Asn Gln Gly Lys Glu Ala Ala Gln Arg Val Leu Ser Gln
1430 1435 1440

Ile Asp Val Ala Gln Lys Lys Leu Gln Asp Val Ser Met Lys Phe
1445 1450 1455

Arg Leu Phe Gln Lys Pro Ala Asn Phe Glu Gln Arg Leu Gln Glu
1460 1465 1470

Ser Lys Met Ile Leu Asp Glu Val Lys Met His Leu Pro Ala Leu
1475 1480 1485

Glu Thr Lys Ser Val Glu Gln Glu Val Val Gln Ser Gln Leu Asn
1490 1495 1500

His Cys Val Asn Leu Tyr Lys Ser Leu Ser Glu Val Lys Ser Glu
1505 1510 1515

Val Glu Met Val Ile Lys Thr Gly Arg Gln Ile Val Gln Lys Lys
1520 1525 1530

Gln Thr Glu Asn Pro Lys Glu Leu Asp Glu Arg Val Thr Ala Leu
1535 1540 1545

Lys Leu His Tyr Asn Glu Leu Gly Ala Lys Val Thr Glu Arg Lys
1550 1555 1560

ES 2 867 809 T3

Gln Gln Leu Glu Lys Cys Leu Lys Leu Ser Arg Lys Met Arg Lys
 1565 1570 1575

Glu Met Asn Val Leu Thr Glu Trp Leu Ala Ala Thr Asp Met Glu
 1580 1585 1590

Leu Thr Lys Arg Ser Ala Val Glu Gly Met Pro Ser Asn Leu Asp
 1595 1600 1605

Ser Glu Val Ala Trp Gly Lys Ala Thr Gln Lys Glu Ile Glu Lys
 1610 1615 1620

Gln Lys Val His Leu Lys Ser Ile Thr Glu Val Gly Glu Ala Leu
 1625 1630 1635

Lys Thr Val Leu Gly Lys Lys Glu Thr Leu Val Glu Asp Lys Leu
 1640 1645 1650

Ser Leu Leu Asn Ser Asn Trp Ile Ala Val Thr Ser Arg Ala Glu
 1655 1660 1665

Glu Trp Leu Asn Leu Leu Leu Glu Tyr Gln Lys His Met Glu Thr
 1670 1675 1680

Phe Asp Gln Asn Val Asp His Ile Thr Lys Trp Ile Ile Gln Ala
 1685 1690 1695

Asp Thr Leu Leu Asp Glu Ser Glu Lys Lys Lys Pro Gln Gln Lys
 1700 1705 1710

Glu Asp Val Leu Lys Arg Leu Lys Ala Glu Leu Asn Asp Ile Arg
 1715 1720 1725

Pro Lys Val Asp Ser Thr Arg Asp Gln Ala Ala Asn Leu Met Ala
 1730 1735 1740

Asn Arg Gly Asp His Cys Arg Lys Leu Val Glu Pro Gln Ile Ser
 1745 1750 1755

Glu Leu Asn His Arg Phe Ala Ala Ile Ser His Arg Ile Lys Thr
 1760 1765 1770

Gly Lys Ala Ser Ile Pro Leu Lys Glu Leu Glu Gln Phe Asn Ser
 1775 1780 1785

Asp Ile Gln Lys Leu Leu Glu Pro Leu Glu Ala Glu Ile Gln Gln
 1790 1795 1800

ES 2 867 809 T3

Gly Val Asn Leu Lys Glu Glu Asp Phe Asn Lys Asp Met Asn Glu
1805 1810 1815

Asp Asn Glu Gly Thr Val Lys Glu Leu Leu Gln Arg Gly Asp Asn
1820 1825 1830

Leu Gln Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Lys Arg Glu Glu Ile Lys
1835 1840 1845

Ile Lys Gln Gln Leu Leu Gln Thr Lys His Asn Ala Leu Lys Asp
1850 1855 1860

Leu Arg Ser Gln Arg Arg Lys Lys Ala Leu Glu Ile Ser His Gln
1865 1870 1875

Trp Tyr Gln Tyr Lys Arg Gln Ala Asp Asp Leu Leu Lys Cys Leu
1880 1885 1890

Asp Asp Ile Glu Lys Lys Leu Ala Ser Leu Pro Glu Pro Arg Asp
1895 1900 1905

Glu Arg Lys Ile Lys Glu Ile Asp Arg Glu Leu Gln Lys Lys Lys
1910 1915 1920

Glu Glu Leu Asn Ala Val Arg Arg Gln Ala Glu Gly Leu Ser Glu
1925 1930 1935

Asp Gly Ala Ala Met Ala Val Glu Pro Thr Gln Ile Gln Leu Ser
1940 1945 1950

Lys Arg Trp Arg Glu Ile Glu Ser Lys Phe Ala Gln Phe Arg Arg
1955 1960 1965

Leu Asn Phe Ala Gln Ile His Thr Val Arg Glu Glu Thr Met Met
1970 1975 1980

Val Met Thr Glu Asp Met Pro Leu Glu Ile Ser Tyr Val Pro Ser
1985 1990 1995

Thr Tyr Leu Thr Glu Ile Thr His Val Ser Gln Ala Leu Leu Glu
2000 2005 2010

Val Glu Gln Leu Leu Asn Ala Pro Asp Leu Cys Ala Lys Asp Phe
2015 2020 2025

Glu Asp Leu Phe Lys Gln Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ile Lys Asp

ES 2 867 809 T3

2030						2035								2040
Ser	Leu	Gln	Gln	Ser	Ser	Gly	Arg	Ile	Asp	Ile	Ile	His	Ser	Lys
2045						2050					2055			
Lys	Thr	Ala	Ala	Leu	Gln	Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Glu	Arg	Val	Lys
2060						2065					2070			
Leu	Gln	Glu	Ala	Leu	Ser	Gln	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Glu	Lys	Val
2075						2080					2085			
Asn	Lys	Met	Tyr	Lys	Asp	Arg	Gln	Gly	Arg	Phe	Asp	Arg	Ser	Val
2090						2095					2100			
Glu	Lys	Trp	Arg	Arg	Phe	His	Tyr	Asp	Ile	Lys	Ile	Phe	Asn	Gln
2105						2110					2115			
Trp	Leu	Thr	Glu	Ala	Glu	Gln	Phe	Leu	Arg	Lys	Thr	Gln	Ile	Pro
2120						2125					2130			
Glu	Asn	Trp	Glu	His	Ala	Lys	Tyr	Lys	Trp	Tyr	Leu	Lys	Glu	Leu
2135						2140					2145			
Gln	Asp	Gly	Ile	Gly	Gln	Arg	Gln	Thr	Val	Val	Arg	Thr	Leu	Asn
2150						2155					2160			
Ala	Thr	Gly	Glu	Glu	Ile	Ile	Gln	Gln	Ser	Ser	Lys	Thr	Asp	Ala
2165						2170					2175			
Ser	Ile	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Gly	Ser	Leu	Asn	Leu	Arg	Trp	Gln
2180						2185					2190			
Glu	Val	Cys	Lys	Gln	Leu	Ser	Asp	Arg	Lys	Lys	Arg	Leu	Glu	Glu
2195						2200					2205			
Gln	Lys	Asn	Ile	Leu	Ser	Glu	Phe	Gln	Arg	Asp	Leu	Asn	Glu	Phe
2210						2215					2220			
Val	Leu	Trp	Leu	Glu	Glu	Ala	Asp	Asn	Ile	Ala	Ser	Ile	Pro	Leu
2225						2230					2235			
Glu	Pro	Gly	Lys	Glu	Gln	Gln	Leu	Lys	Glu	Lys	Leu	Glu	Gln	Val
2240						2245					2250			
Lys	Leu	Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Pro	Leu	Arg	Gln	Gly	Ile	Leu	Lys
2255						2260					2265			

ES 2 867 809 T3

Gln Leu Asn Glu Thr Gly Gly Pro Val Leu Val Ser Ala Pro Ile
 2270 2275 2280

Ser Pro Glu Glu Gln Asp Lys Leu Glu Asn Lys Leu Lys Gln Thr
 2285 2290 2295

Asn Leu Gln Trp Ile Lys Val Ser Arg Ala Leu Pro Glu Lys Gln
 2300 2305 2310

Gly Glu Ile Glu Ala Gln Ile Lys Asp Leu Gly Gln Leu Glu Lys
 2315 2320 2325

Lys Leu Glu Asp Leu Glu Glu Gln Leu Asn His Leu Leu Leu Trp
 2330 2335 2340

Leu Ser Pro Ile Arg Asn Gln Leu Glu Ile Tyr Asn Gln Pro Asn
 2345 2350 2355

Gln Glu Gly Pro Phe Asp Val Gln Glu Thr Glu Ile Ala Val Gln
 2360 2365 2370

Ala Lys Gln Pro Asp Val Glu Glu Ile Leu Ser Lys Gly Gln His
 2375 2380 2385

Leu Tyr Lys Glu Lys Pro Ala Thr Gln Pro Val Lys Arg Lys Leu
 2390 2395 2400

Glu Asp Leu Ser Ser Glu Trp Lys Ala Val Asn Arg Leu Leu Gln
 2405 2410 2415

Glu Leu Arg Ala Lys Gln Pro Asp Leu Ala Pro Gly Leu Thr Thr
 2420 2425 2430

Ile Gly Ala Ser Pro Thr Gln Thr Val Thr Leu Val Thr Gln Pro
 2435 2440 2445

Val Val Thr Lys Glu Thr Ala Ile Ser Lys Leu Glu Met Pro Ser
 2450 2455 2460

Ser Leu Met Leu Glu Val Pro Ala Leu Ala Asp Phe Asn Arg Ala
 2465 2470 2475

Trp Thr Glu Leu Thr Asp Trp Leu Ser Leu Leu Asp Gln Val Ile
 2480 2485 2490

Lys Ser Gln Arg Val Met Val Gly Asp Leu Glu Asp Ile Asn Glu
 2495 2500 2505

ES 2 867 809 T3

Met Ile Ile Lys Gln Lys Ala Thr Met Gln Asp Leu Glu Gln Arg
 2510 2515 2520

Arg Pro Gln Leu Glu Glu Leu Ile Thr Ala Ala Gln Asn Leu Lys
 2525 2530 2535

Asn Lys Thr Ser Asn Gln Glu Ala Arg Thr Ile Ile Thr Asp Arg
 2540 2545 2550

Ile Glu Arg Ile Gln Asn Gln Trp Asp Glu Val Gln Glu His Leu
 2555 2560 2565

Gln Asn Arg Arg Gln Gln Leu Asn Glu Met Leu Lys Asp Ser Thr
 2570 2575 2580

Gln Trp Leu Glu Ala Lys Glu Glu Ala Glu Gln Val Leu Gly Gln
 2585 2590 2595

Ala Arg Ala Lys Leu Glu Ser Trp Lys Glu Gly Pro Tyr Thr Val
 2600 2605 2610

Asp Ala Ile Gln Lys Lys Ile Thr Glu Thr Lys Gln Leu Ala Lys
 2615 2620 2625

Asp Leu Arg Gln Trp Gln Thr Asn Val Asp Val Ala Asn Asp Leu
 2630 2635 2640

Ala Leu Lys Leu Leu Arg Asp Tyr Ser Ala Asp Asp Thr Arg Lys
 2645 2650 2655

Val His Met Ile Thr Glu Asn Ile Asn Ala Ser Trp Arg Ser Ile
 2660 2665 2670

His Lys Arg Val Ser Glu Arg Glu Ala Ala Leu Glu Glu Thr His
 2675 2680 2685

Arg Leu Leu Gln Gln Phe Pro Leu Asp Leu Glu Lys Phe Leu Ala
 2690 2695 2700

Trp Leu Thr Glu Ala Glu Thr Thr Ala Asn Val Leu Gln Asp Ala
 2705 2710 2715

Thr Arg Lys Glu Arg Leu Leu Glu Asp Ser Lys Gly Val Lys Glu
 2720 2725 2730

Leu Met Lys Gln Trp Gln Asp Leu Gln Gly Glu Ile Glu Ala His
 2735 2740 2745

ES 2 867 809 T3

Thr Asp Val Tyr His Asn Leu Asp Glu Asn Ser Gln Lys Ile Leu
 2750 2755 2760

Arg Ser Leu Glu Gly Ser Asp Asp Ala Val Leu Leu Gln Arg Arg
 2765 2770 2775

Leu Asp Asn Met Asn Phe Lys Trp Ser Glu Leu Arg Lys Lys Ser
 2780 2785 2790

Leu Asn Ile Arg Ser His Leu Glu Ala Ser Ser Asp Gln Trp Lys
 2795 2800 2805

Arg Leu His Leu Ser Leu Gln Glu Leu Leu Val Trp Leu Gln Leu
 2810 2815 2820

Lys Asp Asp Glu Leu Ser Arg Gln Ala Pro Ile Gly Gly Asp Phe
 2825 2830 2835

Pro Ala Val Gln Lys Gln Asn Asp Val His Arg Ala Phe Lys Arg
 2840 2845 2850

Glu Leu Lys Thr Lys Glu Pro Val Ile Met Ser Thr Leu Glu Thr
 2855 2860 2865

Val Arg Ile Phe Leu Thr Glu Gln Pro Leu Glu Gly Leu Glu Lys
 2870 2875 2880

Leu Tyr Gln Glu Pro Arg Glu Leu Pro Pro Glu Glu Arg Ala Gln
 2885 2890 2895

Asn Val Thr Arg Leu Leu Arg Lys Gln Ala Glu Glu Val Asn Thr
 2900 2905 2910

Glu Trp Glu Lys Leu Asn Leu His Ser Ala Asp Trp Gln Arg Lys
 2915 2920 2925

Ile Asp Glu Thr Leu Glu Arg Leu Gln Glu Leu Gln Glu Ala Thr
 2930 2935 2940

Asp Glu Leu Asp Leu Lys Leu Arg Gln Ala Glu Val Ile Lys Gly
 2945 2950 2955

Ser Trp Gln Pro Val Gly Asp Leu Leu Ile Asp Ser Leu Gln Asp
 2960 2965 2970

His Leu Glu Lys Val Lys Ala Leu Arg Gly Glu Ile Ala Pro Leu

ES 2 867 809 T3

2975		2980		2985
Lys Glu Asn Val Ser His Val Asn Asp Leu Ala Arg Gln Leu Thr 2990 2995 3000				
Thr Leu Gly Ile Gln Leu Ser Pro Tyr Asn Leu Ser Thr Leu Glu 3005 3010 3015				
Asp Leu Asn Thr Arg Trp Lys Leu Leu Gln Val Ala Val Glu Asp 3020 3025 3030				
Arg Val Arg Gln Leu His Glu Ala His Arg Asp Phe Gly Pro Ala 3035 3040 3045				
Ser Gln His Phe Leu Ser Thr Ser Val Gln Gly Pro Trp Glu Arg 3050 3055 3060				
Ala Ile Ser Pro Asn Lys Val Pro Tyr Tyr Ile Asn His Glu Thr 3065 3070 3075				
Gln Thr Thr Cys Trp Asp His Pro Lys Met Thr Glu Leu Tyr Gln 3080 3085 3090				
Ser Leu Ala Asp Leu Asn Asn Val Arg Phe Ser Ala Tyr Arg Thr 3095 3100 3105				
Ala Met Lys Leu Arg Arg Leu Gln Lys Ala Leu Cys Leu Asp Leu 3110 3115 3120				
Leu Ser Leu Ser Ala Ala Cys Asp Ala Leu Asp Gln His Asn Leu 3125 3130 3135				
Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys 3140 3145 3150				
Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu 3155 3160 3165				
Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu 3170 3175 3180				
Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser 3185 3190 3195				
Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp 3200 3205 3210				

ES 2 867 809 T3

Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe
 3215 3220 3225

Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln
 3230 3235 3240

Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn
 3245 3250 3255

Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys
 3260 3265 3270

Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu
 3275 3280 3285

Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala
 3290 3295 3300

Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu
 3305 3310 3315

Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn
 3320 3325 3330

Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys
 3335 3340 3345

Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr
 3350 3355 3360

Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn
 3365 3370 3375

Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly
 3380 3385 3390

Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr
 3395 3400 3405

Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala
 3410 3415 3420

Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu
 3425 3430 3435

His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser
 3440 3445 3450

ES 2 867 809 T3

Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu
 3455 3460 3465

 His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser
 3470 3475 3480

 Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu
 3485 3490 3495

 Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu
 3500 3505 3510

 Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys
 3515 3520 3525

 Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro
 3530 3535 3540

 Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu
 3545 3550 3555

 Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu
 3560 3565 3570

 Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser
 3575 3580 3585

 Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu
 3590 3595 3600

 Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu
 3605 3610 3615

 Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly
 3620 3625 3630

 Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro
 3635 3640 3645

 Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu
 3650 3655 3660

 Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys
 3665 3670 3675

 Pro Met Arg Glu Asp Thr Met
 3680 3685

REIVINDICACIONES

1. Oligonucleótido antisentido que consiste en la secuencia de 5' GUUCAGCUUCUGUUAGCC 3' (SEQ ID Nº: 49).
- 5 2. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, donde al menos uno de los nucleótidos es un análogo de nucleótido.
3. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 2, donde el análogo de nucleótido tiene una base modificada y/o un esqueleto modificado y/o un enlace internucleósido no natural, o una combinación de estas modificaciones.
- 10 4. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 3, que es un oligómero de morfolino fosfordiamidato (PMO), un ácido nucleico de péptido (ANP) o un ácido nucleico bloqueado (ANB).
- 15 5. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 3, donde dicho oligonucleótido antisentido es un oligorribonucleótido de 2'-O-alkilfosforotioato.
6. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 5, donde dicho oligonucleótido antisentido es un oligorribonucleótido de 2'-O-metilfosforotioato.
- 20 7. Un vector basado en virus, que comprende un casete de expresión que se conduce por un promotor de Pol III como se define en la reivindicación 1.
8. Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el vector de la reivindicación 7 y un portador aceptable farmacéutico.
- 25 9. Uso del oligonucleótido antisentido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el vector de la reivindicación 7, para la inducción *in vitro* del salto del exón del pre-ARNm de distrofina.
- 30 10. Oligonucleótido antisentido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el vector de la reivindicación 7, o composición farmacéutica de la reivindicación 8, para uso como medicamento para tratar un paciente de DMD o DMB.
- 35 11. Un método *in vitro* para la inducción del salto del exón 44 del pre-ARNm de distrofina en una célula, comprendiendo el método proporcionar dicha célula con un oligonucleótido antisentido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o el vector de la reivindicación 7, o la composición farmacéutica de la reivindicación 8.

Fig. 1a

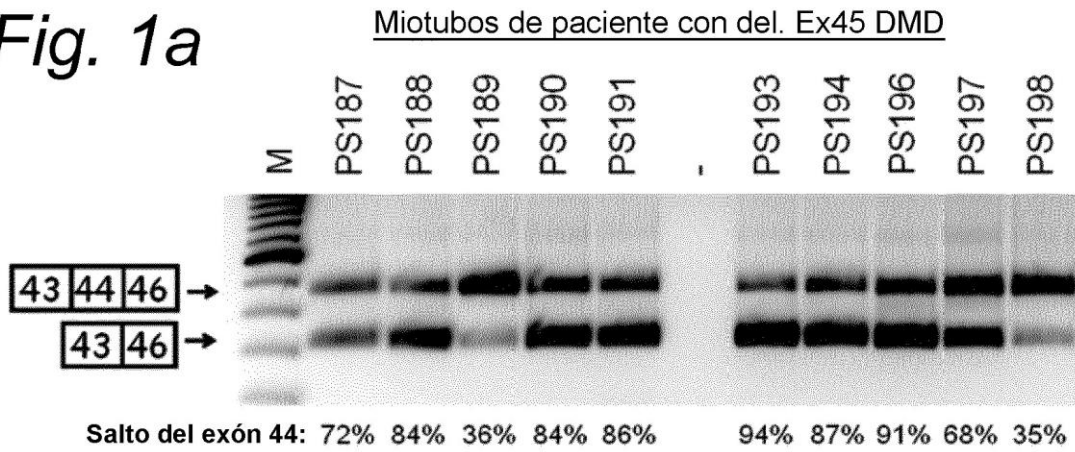


Fig. 1b

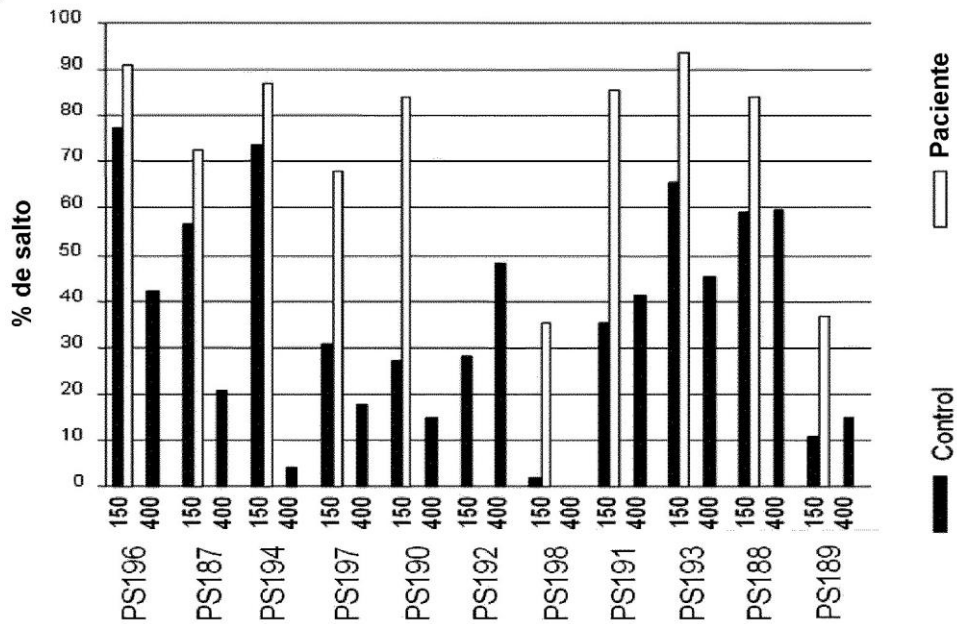


Fig. 1c

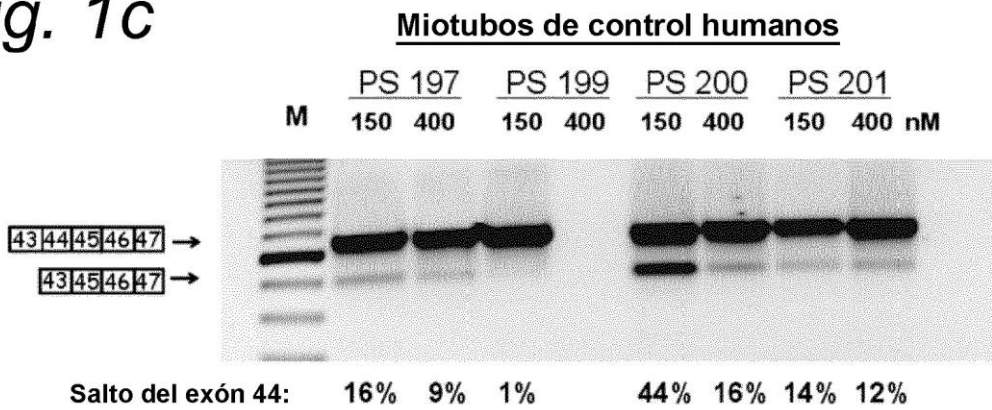


Fig. 2a

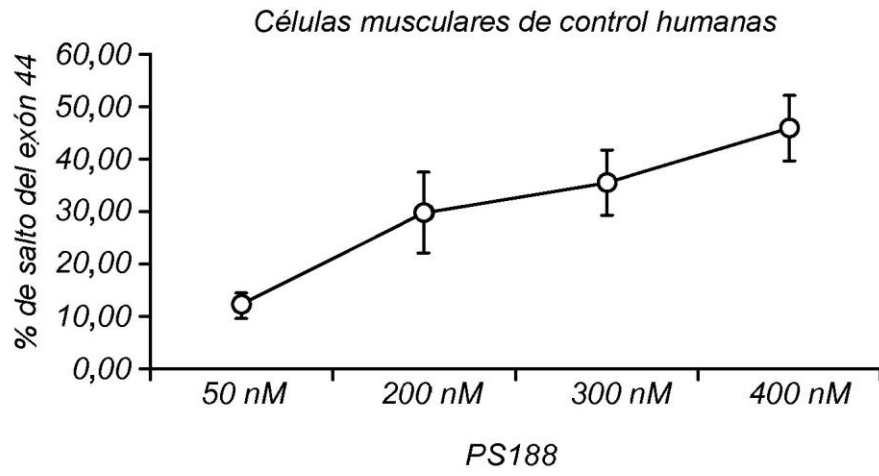


Fig. 2b

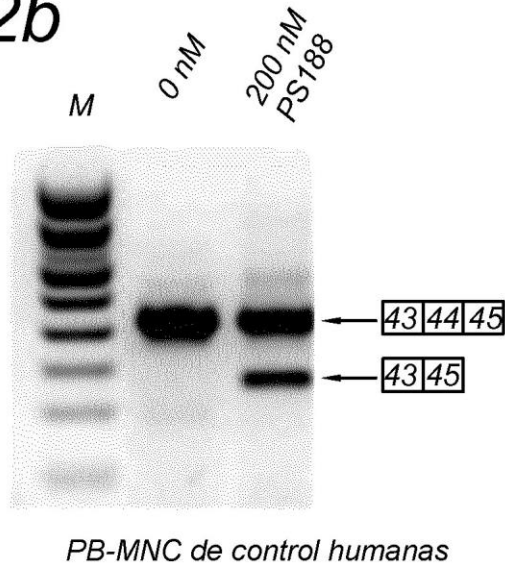


Fig. 3a

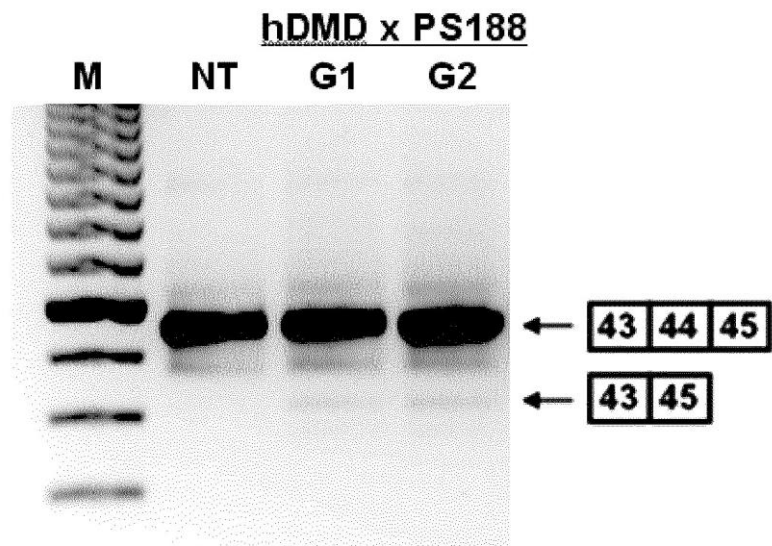


Fig. 3b

