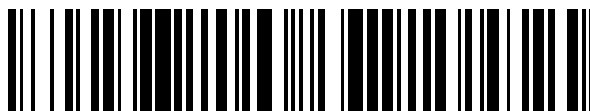


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 658**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.01.2009** **E 13160338 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016** **EP 2607484**

54 Título: **Procedimientos y medios para el salto eficiente del exón 45 en el pre-ARNm de la distrofia muscular de Duchenne**

30 Prioridad:

**27.10.2008 WO PCT/NL2008/050673**

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

**07.03.2016**

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:

**DE KIMPE, JOSEPHUS JOHANNES;**

**PLATENBURG, GERARDUS JOHANNES;**

**VAN DEUTEKOM, JUDITH CHRISTINA**

**THEODORA;**

**AARTSMA-RUS, ANNEMIEKE y**

**VAN OMMEN, GARRIT-JAN BOUDEWIJN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 562 658 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

Procedimientos y medios para el salto eficiente del exón 45 en el pre-ARNm de la distrofia muscular de Duchenne

**Campo**

5 La invención se refiere al campo de la genética, más específicamente de la genética humana. La invención en particular se refiere a la modulación de ajuste en el pre-ARNm de la distrofia muscular de Duchenne humana.

**Antecedentes de la invención**

10 Las miopatías son trastornos que dan como resultado dificultad funcional de músculos. Distrofia muscular (MD) hace referencia a enfermedades genéticas que se caracterizan por debilidad y degeneración progresiva de los músculos esqueléticos. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD) son las formas infantiles más comunes de distrofia muscular. Son trastornos recesivos y debido a que el gen responsable de DMD y BMD reside en el cromosoma X, las mutaciones afectan principalmente a varones con una incidencia de aproximadamente 1 de cada 3500 niños.

15 DMD y BMD están causadas por defectos genéticos en el gen DMD que codifica distrofina, una proteína muscular que se requiere para interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular para mantener estabilidad de las fibras musculares durante la contracción. DMD es un trastorno grave, neuromuscular letal que da como resultado una dependencia del apoyo de una silla de ruedas antes de la edad de 12 años y los pacientes de DMD mueren frecuentemente antes de la edad de treinta debido a fallo respiratorio o a fallo cardíaco. En contraste, los pacientes de BMD frecuentemente mantienen su capacidad de andar hasta más adelante en su vida y tienen expectativas de vida cercanas a las normales. Las mutaciones de DMD en el gen DMD se caracterizan principalmente por inserciones de cambio de marco o por deleciones o por mutaciones puntuales sin sentido, que dan como resultado la ausencia de distrofina funcional. Las mutaciones de BMD en general mantienen el marco de lectura intacto, permitiendo síntesis de una distrofina parcialmente funcional.

20 Durante la última década, la modificación específica de ajuste con el fin de restaurar la fase de lectura alterada del transcrito de DMD ha surgido como una terapia prometedora para distrofia muscular de Duchenne (DMD) (van Ommen, van Deutekom, Aartsma-Rus, Curr Opin Mol Ther. 2008; 10(2): 140-9, Yokota, Duddy, Partidge, Acta Myol. 2007; 26(3): 179-84, van Deutekom et al., N Engl J Med. 2007; 357(26): 2677-86).

25 Usando oligonucleótidos antisentido (AON) que interfieren con señales de ajuste se puede inducir el salto de exones específicos en el pre-ARNm de DMD, restaurando así la fase de lectura abierta y convirtiendo la DMD grave en un fenotipo de BMD más leve (van Deutekom et al. Hum Mol Genet. 2001; 10: 1547-54; Aartsma-Rus et al., Hum Mol Genet 2003; 12(8): 907-14). El salto de exón interfiriendo con los sitios potenciadores de ajuste exónico (ESE) del gen DMD se demostró en el documento WO 2007/135105 A1. Una secuencia potenciadora de ajuste para el exón 45 se identificó en el documento EP1191098, el marcado como objetivo de este sitio parece tener como resultado el salto del exón 45 en una micro-construcción genética. Más recientemente, se divulgaron varios oligonucleótidos antisentido que tienen como objetivo el exón 45 en el documento WO 2010/048586. *In vivo* la prueba de concepto se obtuvo primero en el modelo de ratón de *mdx*, que es deficiente en distrofina debido a una mutación sin sentido en el exón 23. Las inyecciones intramuscular e intravenosa de AON que tienen como objetivo el exón mutado 23 restauran la expresión de distrofina durante al menos tres meses (Lu et al. Nat Med. 2003; 8: 1009-14; Lu et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2005; 102(1): 198-203). Esto se acompañó de restauración de proteínas asociadas a distrofina en la membrana de fibras así como de mejora funcional del músculo tratado. El salto *in vivo* de exones humanos se ha logrado en el modelo de ratón de hDMD, que contiene una copia completa del gen DMD humano integrado en el cromosoma 5 del ratón (Bremmer-Bout et al. Molecular Therapy. 2004; 10: 232-40; t Hoen et al. J Biol Chem. 2008; 283: 5899-907).

35 Como la mayoría de los pacientes de DMD tienen deleciones que se agrupan en zonas críticas, el salto de un número pequeño de exones es aplicable a números de pacientes relativamente grandes. La aplicabilidad real del salto de exones puede determinarse por deleciones, duplicaciones y mutaciones puntuales comunicadas en bases de datos de mutaciones de DMD tales como la base de datos de mutaciones de DMD de Leiden disponible en [www.dmd.nl](http://www.dmd.nl). El salto terapéutico del exón 45 del pre-ARNm de DMD restauraría la fase de lectura abierta de pacientes de DMD que tienen deleciones incluyendo pero no limitadas a exones 12-44, 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, 46-55, 46-59, 46-60 del pre-ARNm de DMD, que tienen lugar en un total del 16 % de todos los pacientes de DMD con una deleción (Aartsma-Rus y van Deutekom, 2007, Antisense Elements (Genetics) Research Focus, 2007 Nova Science Publishers, Inc.). Además, para algunos pacientes de DMD se requiere el salto simultáneo de uno o más exones además del exón 45, tales como los exones 51 o 53 para restaurar la fase de lectura correcta. Ejemplos no limitantes incluyen pacientes con una deleción de exones 46-50 que requieren el co-salto de los exones 45 y 51, o con una deleción de exones 46-52 que requieren el co-salto de los exones 45 y 53.

40 Recientemente, se completó exitosamente un primer estudio en seres humanos donde un AON que induce el salto del exón 51 se inyectó en un área pequeña del músculo tibialis anterior de cuatro pacientes de DMD. Se observó expresión de distrofina novedosa en la mayoría de las fibras musculares en todos los cuatro pacientes tratados y el AON fue seguro y bien tolerado (van Deutekom et al. N Engl J Med. 2007; 357: 2677-86).

La mayoría de los AON estudiados contienen hasta 20 nucleótidos y se ha argüido que este tamaño relativamente pequeño mejora la distribución tisular y/o la penetración celular de un AON. Sin embargo, tales AON cortos darán como resultado una especificidad limitada debida a un riesgo incrementado de la presencia de secuencias idénticas en otra parte en el genoma y una unión al objetivo limitada o una afinidad al objetivo limitada debida a una energía libre baja del complejo AON-objetivo. Por lo tanto los autores de la invención decidieron diseñar oligonucleótidos nuevos y opcionalmente mejorados que no deberían presentar todos estos inconvenientes.

### Descripción de la invención

#### Procedimiento

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento para inducir y/o promover el salto del exón 45 del pre-ARNm en un paciente, preferentemente en una célula aislada de dicho paciente, comprendiendo el procedimiento proporcionar a dicha célula y/o a dicho paciente una molécula que une un tramo continuo de al menos 21 nucleótidos dentro de dicho exón en el que dicho tramo y dicha molécula son según se definen en la reivindicación 1.

De acuerdo con ello, se suministra en este acto un procedimiento para inducir y/o promover el salto del exón 45 de pre-ARNm de DMD, preferentemente en una célula aislada de un paciente, comprendiendo el procedimiento proporcionar a dicha célula y/o a dicho paciente una molécula que une un tramo continuo de al menos 21 nucleótidos dentro de dicho exón en el que dicho tramo y dicha molécula son según se definen en la reivindicación 1.

Se entiende que dicho procedimiento abarca un procedimiento *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

Según se define en el presente documento un pre-ARNm de DMD preferentemente quiere decir el pre-ARNm de un gen DMD o de un paciente de DMD o de BMD. El gen o la proteína de DMD corresponde al gen o la proteína de la distrofina.

Un paciente se desea preferentemente para querer decir un paciente que tiene DMD o BMD según se define más adelante en el presente documento o un paciente susceptible de desarrollar DMD o BMD debido a su origen genético.

Salto del exón se refiere a la inducción en una célula de un ARNm maduro que no contiene un exón particular que normalmente está presente en él. El salto del exón se logra proporcionando 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 ayuste o la secuencia aceptora de ayuste que se requieren ambas para permitir el procedimiento enzimático de ayuste, o una molécula que es capaz de interferir con una señal de inclusión de exón requerida para el reconocimiento de un tramo de nucleótidos como un exón a incluirse en el ARNm. El término pre-ARNm se refiere a un ARNm precursor no procesado o procesado parcialmente que se sintetiza a partir de una plantilla de ADN en el núcleo celular por transcripción.

Dentro del contexto de la invención inducir y/o promover salto de un exón como se indica en el presente documento quiere decir que al menos el 1 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del ARNm de DMD en una o más células (musculares) de un paciente tratado no contendrá dicho exón. Esto se valora preferentemente por PCR según se define en los ejemplos.

Preferentemente, un procedimiento *in vitro* de la invención induciendo o promoviendo salto del exón 45 del pre-ARNm de DMD en una o más células de un paciente proporciona a dicho paciente una proteína distrofina funcional y/o disminuye la producción de una proteína distrofina aberrante en dicho paciente. Por lo tanto un procedimiento preferido es un procedimiento, en el que una célula de dicho paciente está provista de una proteína distrofina funcional y/o en el que la producción de una proteína distrofina aberrante en dicho paciente o en una célula de dicho paciente se disminuye.

La disminución de la producción de una distrofina aberrante se puede valorar en el nivel de ARNm y quiere decir preferentemente que el 99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o menos de la cantidad inicial de ARNm de distrofina aberrante, es aún detectable por RT-PCR. Un ARNm de distrofina aberrante o una proteína distrofina aberrante se refiere también en el presente documento como un ARNm de distrofina no funcional o una proteína distrofina no funcional. Una proteína distrofina no funcional es preferentemente una proteína distrofina que no es capaz de unir actina y/o miembros del complejo proteico DGC. Una proteína distrofina no funcional o un ARNm de distrofina no funcional típicamente no tiene, o no codifica una proteína de distrofina con un extremo C-terminal intacto de la proteína.

Incrementar la producción de una distrofina funcional en dicho paciente o en una célula de dicho paciente puede valorarse en el nivel de ARNm (por análisis de RT-PCR) y preferentemente quiere decir que una cantidad detectable de un ARNm de distrofina funcional es detectable por RT-PCR. En otra realización, el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del ARNm de distrofina detectable es un ARNm de distrofina funcional. Incrementar la producción de una distrofina funcional en una célula de dicho paciente puede valorarse en el nivel de proteína (por análisis de inmunofluorescencia y por análisis de bandas de western) y preferentemente quiere decir que una cantidad detectable de una proteína distrofina funcional es detectable por análisis de inmunofluorescencia o por análisis de bandas de western. En otra realización, el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90

% o más de la proteína distrofina detectable es una proteína distrofina funcional

Según se define en el presente documento, una distrofina funcional es preferentemente una distrofina de tipo silvestre que corresponde a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se identifica en la SEC ID N.º: 1. Una distrofina funcional es preferentemente una distrofina, que tiene un dominio de unión a actina en su parte N-terminal (primeros 240 aminoácidos en el extremo N-terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácidos 3361 hasta 3685) y un dominio C-terminal (últimos 325 aminoácidos en el extremo C-terminal) estando presente cada uno de estos dominios en una distrofina de tipo silvestre como se conoce por la persona experta. Los aminoácidos indicados en el presente documento corresponden a aminoácidos de la distrofina de tipo silvestre que están representados por SEC ID N.º: 1. En otras palabras, una distrofina funcional es una distrofina que presenta al menos en algún grado una actividad de una distrofina de tipo silvestre. "Al menos en algún grado" preferentemente quiere decir al menos al 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de una actividad correspondiente de una distrofina funcional de tipo silvestre. En este contexto, una actividad de una distrofina funcional es preferentemente unirse a actina y al complejo gluco proteico asociado 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 puede visualizarse bien por co-inmunoprecipitación usando extractos de proteína totales o bien por análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales, a partir de una biopsia muscular, como se conoce por la persona experta.

Individuos o pacientes que sufren de distrofia muscular de Duchenne tienen típicamente una mutación en el gen DMD que impide síntesis de la proteína de distrofina completa, es decir una parada prematura impide la síntesis del extremo C-terminal. En la distrofia muscular de Becker el gen DMD también comprende una mutación comparado con el gen de tipo silvestre pero la mutación típicamente no induce una parada prematura y el extremo C-terminal típicamente se sintetiza. Como un resultado se sintetiza una proteína distrofina funcional que tiene al menos la misma actividad en clase que la proteína de tipo silvestre, aunque no necesariamente la misma cantidad de actividad. El genoma de un individuo con BMD codifica típicamente una proteína de distrofina que comprende la parte N-terminal (primeros 240 aminoácidos en el extremo N-terminal), un dominio rico en cisteínas (aminoácidos 3361 hasta 3685) y un dominio C-terminal (últimos 325 aminoácidos en el extremo C-terminal) pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo silvestre (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 salto del exón para el tratamiento de DMD está orientado típicamente a superar una parada prematura en el pre-ARNm omitiendo un exón en el dominio con forma de barra para corregir el marco de lectura y para permitir la síntesis del resto de la proteína distrofina incluyendo el extremo C-terminal, aunque la proteína es algo menor como resultado de un dominio de barra menor. En una realización preferida, un individuo que tiene DMD y que se está tratando por un procedimiento según se define en el presente documento estará provisto de una distrofina que presente al menos en algún grado una actividad de una distrofina de tipo silvestre. Más preferentemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que puede ser un paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina de un individuo que tiene BMD: típicamente dicha distrofina es capaz de interactuar tanto con actina como con el DGC, pero su dominio en forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo silvestre (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 con forma de barra central de distrofina de tipo silvestre comprende 24 repeticiones similares a 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 con forma de barra central de una distrofina como se proporciona en el presente documento puede comprender 5 a 23, 10 a 22 o 12 a 18 repeticiones similares a espectrina así como puede unirse a actina y a DGC.

Un procedimiento de la invención in vitro puede aliviar una o más características de una célula muscular de un paciente de DMD que comprende deleciones que incluyen pero no se limitan a exones 12-44, 18-44, 44, 46, 46-47, 46-48, 46-49, 46-51, 46-53, 46-55, 46-59, 46-60 del pre-ARNm de DMD de dicho paciente (Aartsma-Rus y van Deutekom, 2007, Antisense Elements (Genetics) Research Focus, 2007 Nova Science Publishers, Inc) así como de pacientes de DMD que requieren el salto simultáneo de uno o más exones además del exón 45 que incluyen pero no se limitan a pacientes con una deleción de exones 46-50 que requieren el co-salto de los exones 45 y 51, o con una deleción de exones 46-52 que requieren el co-salto de los exones 45 y 53.

En un procedimiento preferido, uno o más síntoma(s) o característica(s) de una célula miogénica o de una célula muscular de un paciente de DMD se alivia(n). Tales síntomas o características pueden evaluarse al nivel celular, al nivel tisular o en el propio paciente.

Un alivio de uno o más síntomas o características puede valorarse por cualquiera de los siguientes ensayos en una célula miogénica o célula muscular de un paciente: captación 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, integridad, y/o supervivencia mejoradas. Estos parámetros se valoran usualmente usando análisis de inmunofluorescencia y/o análisis de histoquímica de secciones transversales de biopsias musculares.

La mejora de la función, de la integridad y/o de la supervivencia de fibras musculares se puede valorar usando al

menos uno de los siguientes ensayos: un decrecimiento detectable de creatina cinasa en la sangre, un decrecimiento detectable de necrosis de fibras musculares en una sección transversal de biopsia de un músculo sospechoso de ser distrófico, y/o un incremento detectable de la homogeneidad del diámetro de fibras musculares en una sección transversal de biopsia de un músculo sospechoso de ser distrófico. Cada uno de estos ensayos se conoce por la persona experta.

Se puede detectar en sangre creatina cinasa según se describe en Hodgetts et al (Hodgetts S., et al, (2006), Neuromuscular Disorders, 16: 591-602, 2006). Un decrecimiento detectable en creatina cinasa puede querer decir un decrecimiento del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más comparado con la concentración de creatina cinasa en un mismo paciente de DMD antes del tratamiento.

Un decrecimiento detectable de necrosis de fibras musculares se valora preferentemente en una biopsia muscular, más preferentemente como se describe en Hodgetts et al (Hodgetts S., et al, (2006), Neuromuscular Disorders, 16: 591-602, 2006) usando secciones transversales de biopsia. Un decrecimiento detectable de necrosis puede ser un decrecimiento del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del área en la que se ha identificado necrosis usando secciones transversales de biopsias. El decrecimiento se mide por comparación con la necrosis como se valora en un mismo paciente de DMD antes de tratamiento.

Un incremento detectable de la homogeneidad del diámetro de fibras musculares se valora preferentemente en una sección transversal de biopsia muscular, más preferentemente según se describe en Hodgetts et al (Hodgetts S., et al, (2006), Neuromuscular Disorders, 16: 591-602, 2006). El incremento se mide por comparación con la homogeneidad del diámetro de fibras musculares en una sección transversal de biopsia muscular de un mismo paciente de DMD antes del tratamiento.

Un alivio de uno o más síntomas o características puede valorarse por cualquiera de los siguientes ensayos en el propio paciente: prolongación del tiempo hasta la pérdida de la marcha, mejora de la fuerza muscular, mejora de la capacidad para levantar peso, mejora del tiempo tomado para levantarse del suelo, mejora en el tiempo para caminar nueve metros, mejora en el tiempo tomado 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 se conoce por la persona experta. Como un 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 se haya encontrado una mejora o prolongación detectable de un parámetro medido en un ensayo, ello querrá decir preferentemente que uno o más síntomas de la Distrofia Muscular de Duchenne se han aliviado en un individuo usando un procedimiento de la invención. La mejora o prolongación detectable es preferentemente una mejora estadísticamente significativa o una prolongación según se describe en Hodgetts et al (Hodgetts S., et al, (2006), Neuromuscular Disorders, 16: 591-602, 2006). Alternativamente, el alivio de uno o más síntoma(s) de la Distrofia Muscular de Duchenne puede valorarse midiendo una mejora de una función, de la integridad y/o de la supervivencia de fibras musculares según se define más tarde en el presente documento.

Un tratamiento puede tener una duración de 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. La frecuencia de administración de un oligonucleótido, una composición, un compuesto de la invención puede depender de varios parámetros tales como la edad del paciente, el tipo de mutación, el número de moléculas (dosis), la formulación de dicha molécula. La frecuencia puede variarse entre al menos una vez en un periodo de tiempo de dos semanas, o de tres semanas o de cuatro semanas o de cinco semanas o en un periodo de tiempo más largo. Cada molécula u oligonucleótido o equivalente de los mismos según se define en el presente documento para uso de acuerdo con la invención puede ser adecuado para administración directa a una célula, tejido y/o un órgano *in vivo* de individuos afectados por o en riesgo de desarrollar DMD y puede administrarse directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Un oligonucleótido como se usa en el presente documento puede ser adecuado para administración a una célula, tejido y/o un órgano *in vivo* de individuos afectados por o en riesgo de desarrollar DMD y puede administrarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Dicho oligonucleótido puede administrarse directamente o indirectamente a una célula, tejido y/o un órgano *in vivo* de un individuo afectado por o en riesgo de desarrollar DMD y puede administrarse directa o indirectamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Como la distrofia muscular de Duchenne tiene un fenotipo pronunciado en células musculares, se prefiere que dichas células sean células musculares, se prefiere adicionalmente que dicho tejido sea un tejido muscular y/o se prefiere adicionalmente que dicho órgano comprenda o consista en un tejido muscular. Un órgano preferido es el corazón. Preferentemente dichas células comprenden un gen que codifica una proteína distrofina mutante. Preferentemente dichas células son células de un individuo que sufre de DMD.

Una molécula u oligonucleótido o equivalente del mismo puede administrarse como está a una célula. Cuando se administra dicha molécula, oligonucleótido o equivalente de los mismos a un individuo, se prefiere que esté disuelto en una solución que sea compatible con el procedimiento de administración. Para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intraventricular se prefiere que la solución sea una solución salina fisiológica. Se prefiere particularmente para un procedimiento de la invención el uso de un excipiente que potenciará adicionalmente la administración de dicha molécula, oligonucleótido o equivalente funcional de los mismos según se define en el presente documento, a una célula y dentro de una célula, preferentemente una célula muscular. El excipiente preferido se define en la sección titulada "composición farmacéutica". *In vitro*, los autores de la presente

invención han obtenido resultados muy buenos usando polietilenimina (PEI, ExGen500, MBI Fermentas), como se muestra en el ejemplo.

En un procedimiento preferido de la invención, se usa una molécula adicional que es capaz de inducir y/o promover el salto de un exón distinto del pre-ARNm de DMD de un paciente. Preferentemente, el segundo exón se selecciona a partir de: exón 7, 44, 46, 51, 53, 59, 67 del pre-ARNm de la distrofina de un paciente. Moléculas que se pueden usar se representan en la tabla 2. Moléculas preferidas comprenden o consisten en cualquiera de los oligonucleótidos como se divulgan en la tabla 2. Varios oligonucleótidos se pueden usar también en combinación. De esta forma, se impide la inclusión de dos o más exones de un pre-ARNm de DMD en ARNm producido a partir de este pre-ARNm. Esta realización se refiere adicionalmente como salto de exón doble o de multi-exón (Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004; 74(1): 83-92, Aartsma-Rus A, Kaman WE, Weij R, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Exploring the frontiers of therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy by double targeting within one or multiple exons. *Mol Ther* 2006; 14(3): 401-7). En la mayoría de los casos el salto del exón doble da como resultado la exclusión de solo los dos exones objetivo del pre-ARNm de la distrofina. Sin embargo, en otros casos se encontró que los exones objetivo y la región entera entre dichos exones en dicho pre-ARNm no están presentes en el ARNm producido incluso cuando otros exones (exones que intervienen) estaban presentes en tal región. Este multi-salto era principalmente así para la combinación de oligonucleótidos derivados del gen DMD, en la que un oligonucleótido para exón 45 y un oligonucleótido para exón 51 se añadieron a una célula que transcribe el gen DMD. Un diseño tal dio como resultado ARNm que se produce que no contiene exones 45 a 51. Aparentemente, la estructura del pre-ARNm en presencia de los oligonucleótidos mencionados fue tal que la maquinaria de ajuste se estimuló para conectar los exones 44 y 52 entre sí.

Es posible promover específicamente el salto de también los exones que intervienen proporcionando un enlace entre los dos oligonucleótidos antisentido complementarios. Así, en una realización tramos de nucleótidos complementarios a al menos dos exones de distrofina están separados por un resto de unión. Los al menos dos tramos de nucleótidos están así unidos en esta realización tal como para formar una molécula individual.

En su caso, se usa más de un compuesto en un procedimiento de la invención, dichos compuestos se pueden administrar a un individuo en cualquier orden. En una realización, dichos compuestos se administran simultáneamente (significando que dichos compuestos se administran en el plazo de 10 horas, preferentemente en el plazo de una hora). Esto sin embargo no es necesario. En otra realización, dichos compuestos se administran secuencialmente.

### 30 **Molécula**

En un segundo aspecto, se proporciona un oligonucleótido antisentido para su uso en un procedimiento según se describe en la sección anterior titulada "Procedimiento". Esta molécula preferentemente comprende o consiste en un oligonucleótido. Dicho oligonucleótido antisentido es preferentemente un oligonucleótido antisentido (AON) o un oligorribonucleótido antisentido.

Se encontró por los actuales investigadores que especialmente el exón 45 está específicamente saltado en una frecuencia alta usando una molécula que se une a un tramo continuo de menos de 21 nucleótidos dentro de dicho exón según se define en la reivindicación 1. Aunque este efecto puede estar asociado con una afinidad de unión más alta de dicha molécula comparada con una molécula que se une a un tramo continuo de menos de 21 nucleótidos, podría haber otros parámetros intracelulares implicados que favorezcan las características termodinámicas, cinéticas, o estructurales del dúplex híbrido. En una realización preferida, se usa una molécula que se une a un tramo continuo de al menos 21, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nucleótidos dentro de dicho exón.

En una realización preferida, una molécula o un oligonucleótido de la invención que comprende una secuencia que es complementaria a una parte del exón 45 de pre-ARNm de DMD es tal que la parte complementaria es al menos el 50 % de la longitud del oligonucleótido de la invención, más preferentemente al menos el 60 %, incluso más preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 80 %, incluso más preferentemente al menos el 90 % o incluso más preferentemente al menos el 95 %, o incluso más preferentemente el 98 % y lo más preferentemente hasta el 100 %. "Una parte del exón 45" preferentemente significa un tramo de al menos 21 nucleótidos. En una realización muy preferida, un oligonucleótido de la invención consiste en una secuencia que es complementaria con parte de pre-ARNm de distrofina del exón 45 según se define en el presente documento. Alternativamente, un oligonucleótido puede comprender una secuencia que es complementaria con parte de pre-ARNm de distrofina de exón 45 según se define en el presente documento y secuencias flanqueantes adicionales. En una realización más preferida, la longitud de dicha parte complementaria de dicho oligonucleótido es de al menos 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 nucleótidos. Se pueden usar diversos tipos de secuencias flanqueantes. Preferentemente, se usan secuencias flanqueantes adicionales para modificar la unión de una proteína a dicha molécula u oligonucleótido, o para modificar una propiedad termodinámica del oligonucleótido, más preferentemente para modificar afinidad de unión a ARN objetivo. En otra realización preferida, secuencias flanqueantes adicionales son complementarias a secuencias del pre-ARNm de DMD que no están presentes en el exón 45. Tales secuencias flanqueantes son preferentemente complementarias a secuencias que comprenden o que consisten en las secuencias consensoceptoras o donantes de sitio de ajuste del exón 45. En una realización preferida, tales secuencias flanqueantes son complementarias a

secuencias que comprenden o que consisten en secuencias de un intrón del pre-ARNm de DMD que está adyacente a exón 45; es decir intrón 44 o 45.

Un tramo continuo de al menos 21, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nucleótidos dentro del exón 45 se selecciona a partir de la secuencia:

5'- CCAGGAUGGCAUUGGGCAGCGGCAAACUGUUGUCAGA  
 ACAUUGAAUGCAACUGGGGAAGAAUAAUUCAGCAAUC -3'

(SEC ID N.º: 2).

Se ha encontrado que una molécula que se une a una secuencia de nucleótidos que comprende o que consiste en un tramo continuo de al menos 21, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nucleótidos de SEC ID N.º: 2 da como resultado salto altamente eficiente de exón 45 en una célula proporcionada con esta molécula. Se encontró que moléculas que unen a una secuencia de nucleótidos que comprende un tramo continuo de menos de 21 nucleótidos de SEC ID N.º: 2 inducían salto del exón en una manera menos eficiente que las moléculas de la divulgación. Por lo tanto, en la divulgación, se proporciona un procedimiento en el que una molécula se une a un tramo continuo de al menos 21, 25, 30, 35 nucleótidos en SEC ID N.º: 2. Al contrario de lo que se piensa generalmente, los autores de la invención encontraron sorprendentemente que se pueden alcanzar una especificidad y una eficiencia de salto de exones más altas usando oligonucleótidos que tengan una longitud de al menos 21 nucleótidos. Ninguna de las secuencias indicadas se deriva de partes conservadas de sitios de unión-ajuste. Por lo tanto, no es probable que dicha molécula medie en el ajuste diferencial de otros exones del pre-ARNm de DMD o de exones de otros genes.

En una realización, una molécula de la invención capaz de interferir con la inclusión de exón 45 del pre-ARNm de DMD es una molécula de compuesto que se une a la secuencia especificada, o una proteína tal como una proteína de unión a ARN o una proteína de dedos de cinc que no se da en la naturaleza que se ha modificado para ser capaz de unirse a la secuencia de nucleótidos indicada en una molécula de ARN. Procedimientos para rastrear moléculas de compuestos que unen secuencias de nucleótidos específicas se divulgan por ejemplo en el documento PCT/NL01/00697 y en la patente de los EE.UU. 6875736, que se incluyen en el presente documento por referencia. Procedimientos para diseñar proteínas de dedos de cinc de unión a ARN que se unen a secuencias de nucleótidos específicas se divulgan por Friesen y Darby, Nature Structural Biology 5: 543-546 (1998) que se incluye en el presente documento por referencia.

En una realización adicional, una molécula de la invención capaz de interferir con la inclusión de exón 45 del pre-ARNm de DMD comprende un oligonucleótido antisentido que es complementario de y puede formar pares de bases con la hebra codificante del pre-ARNm del gen DMD. Dicho oligonucleótido antisentido contiene preferentemente un residuo de ARN, un residuo de ADN, y/o un análogo nucleotídico o equivalente, como se detallará adicionalmente más adelante en el presente documento.

Una molécula preferida de la invención comprende una secuencia basada en nucleótidos o una secuencia de nucleótidos o una secuencia oligonucleotídica antisentido de entre 21 y 50 nucleótidos o bases, más preferida entre 21 y 40 nucleótidos, más preferida entre 21 y 30 nucleótidos, tal como de 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos o 50 nucleótidos.

Una molécula muy preferida de la invención comprende una secuencia basada en nucleótidos de 25 nucleótidos.

Una molécula de la invención se une a un tramo continuo de o es complementaria a o es antisentido con respecto a al menos un tramo continuo de al menos 21 nucleótidos dentro de la secuencia de nucleótidos SEC ID N.º: 2.

En una cierta realización, la invención proporciona una molécula que comprende o que consiste en una secuencia de nucleótidos antisentido seleccionada a partir de las secuencias de nucleótidos antisentido como se representan en la Tabla 1, salvo SEC ID N.º: 68. Una molécula de la invención que es antisentido con respecto a la secuencia de SEC ID N.º: 2, que está presente en el exón 45 del gen DMD comprende preferentemente o consiste preferentemente en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N.º: 3; SEC ID N.º: 4, SEC ID N.º: 5, SEC ID N.º: 6, SEC ID N.º: 7, SEC ID N.º: 8, SEC ID N.º: 9, SEC ID N.º: 10, SEC ID N.º: 11, SEC ID N.º: 12, SEC ID N.º: 13, SEC ID N.º: 14, SEC ID N.º: 15, SEC ID N.º: 16, SEC ID N.º: 17, SEC ID N.º: 18, SEC ID N.º: 19, SEC ID N.º: 20, SEC ID N.º: 21, SEC ID N.º: 22, SEC ID N.º: 23, SEC ID N.º: 24, SEC ID N.º: 25, SEC ID N.º: 26, SEC ID N.º: 27, SEC ID N.º: 28, SEC ID N.º: 29, SEC ID N.º: 30, SEC ID N.º: 31, SEC ID N.º: 32, SEC ID N.º: 33, SEC ID N.º: 34, SEC ID N.º: 35, SEC ID N.º: 36, SEC ID N.º: 37, SEC ID N.º: 38, SEC ID N.º: 39, SEC ID N.º: 40, SEC ID N.º: 41, SEC ID N.º: 42, SEC ID N.º: 43, SEC ID N.º: 44, SEC ID N.º: 45, SEC ID N.º: 46, SEC ID N.º: 47, SEC ID N.º: 48, SEC ID N.º: 49, SEC ID N.º: 50, SEC ID N.º: 51, SEC ID N.º: 52, SEC ID N.º: 53, SEC ID N.º: 54, SEC ID N.º: 55, SEC ID N.º: 56, SEC ID N.º: 57, SEC ID N.º: 58, SEC ID N.º: 59, SEC ID N.º: 60, SEC ID N.º: 61, SEC ID N.º: 62, SEC ID N.º: 63, SEC ID N.º: 64, SEC ID N.º: 65, SEC ID N.º: 66 y/o SEC ID N.º: 67.

En una realización más preferida, la invención proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N.º 3; SEC ID N.º 4, SEC ID N.º 5, SEC ID N.º 6, SEC ID N.º 7 y/o SEC ID N.º 8.

5 En una realización muy preferida, la invención proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de SEC ID N.º 3. Se encontró que esta molécula es muy eficiente modulando el ajuste de exón 45 del pre-ARNm de DMD en una célula muscular.

Una secuencia de nucleótidos de una molécula de la invención puede contener un residuo de ARN, un residuo de ADN, un análogo nucleotídico o equivalente como se detallará adicionalmente más adelante en el presente documento. Además, una molécula de la invención puede abarcar un equivalente funcional de una molécula de la invención según se define en el presente documento.

10 Se prefiere que una molécula de la invención comprenda un o al menos un residuo que esté modificado para incrementar resistencia a nucleasas, y/o para incrementar la afinidad del nucleótido antisentido para la secuencia objetivo. Por lo tanto, en una realización preferida, una secuencia de nucleótidos antisentido comprende un o al menos un análogo nucleotídico o equivalente, en el que un análogo nucleotídico o equivalente se define como un residuo que tiene una base modificada, y/o un armazón modificado, y/o un enlace internucleosídico que no se da en la naturaleza, o una combinación de estas modificaciones.

15 En una realización preferida, un análogo de nucleótido o equivalente comprende un armazón modificado. Ejemplos de tales armazones se proporcionan por armazones morfolínicos, armazones de carbamatos, armazones de siloxano, armazones de sulfuros, sulfóxidos y sulfonas, armazones de formacetilos y de tioformacetilos, armazones de metilformacetilos, armazones de riboacetilos, armazones que contienen alquenos, armazones de sulfamatos, sulfonatos y sulfonamidas, armazones de metilenimido y metilenhidrazino y armazones de amidas. Oligómeros de fosfordiamidato de morfolino son oligonucleótidos de armazones modificados que se han investigado anteriormente como agentes antisentido. Los oligonucleótidos de morfolino tienen un armazón no cargado en el que el azúcar de desoxirribosa de ADN se reemplaza por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster se reemplaza por un enlace de fosfordiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido deteniendo la traducción o interfiriendo con el ajuste de pre-ARNm más que activando RNasa H. Se han administrado con éxito oligonucleótidos morfolínicos a células de cultivos tisulares por procedimientos que alteran físicamente la membrana celular y un estudio que compara varios de estos procedimientos encontró que cargar por raspado fue el procedimiento más eficiente de administración; sin embargo, debido a que el armazón morfolínico no está cargado, los lípidos catiónicos no son medidores efectivos de captación de oligonucleótidos morfolínicos en células. Una comunicación reciente demostró formación de tríplex por un oligonucleótido morfolínico y debido al armazón no iónico, estos estudios mostraron que el oligonucleótido morfolínico fue capaz de formación de tríplex en ausencia de magnesio.

20 Se prefiere adicionalmente que el enlace entre un residuo en un armazón no incluya un átomo de fósforo, tal como un enlace que se forma por enlaces internucleosídicos de alquilos o de cicloalquilos de cadena corta, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta.

25 Un análogo nucleotídico o equivalente preferido comprende un Ácido Peptidonucleico (APN), que tiene un armazón poliamídico modificado (Nielsen, et al. (1991) Science 254: 1497-1500). Las moléculas basadas en APN son verdaderos imitadores de moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. El armazón del APN está compuesto de unidades de *N*-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos, en las que las nucleobases están unidas al armazón por enlaces metilencarbonílicos. Un armazón alternativo comprende un monómero de APN pirrolidínico prolongado en un carbono (Govindaraju y Kumar (2005) Chem. Commun., 495-497). Dado que el armazón de una molécula de APN contiene grupos fosfato no cargados, los híbridos de APN-ARN son usualmente más estables que los híbridos de ARN-ARN o de ARN-ADN, respectivamente (Egholm et al (1993) Nature 365, 566-568).

30 Un armazón adicionalmente preferido comprende un análogo nucleótido morfolínico o equivalente, en el que el azúcar ribosa o desoxirribosa está reemplazado por un anillo morfolínico de 6 miembros. Un análogo nucleotídico o equivalente muy preferido comprende un oligómero de morfolino fosfordiamidato (PMO), en el que el azúcar ribosa o desoxirribosa está reemplazado por un anillo morfolínico de 6 miembros y el enlace fosfodiéster aniónico entre anillos morfolínicos adyacentes está reemplazado por un enlace fosfordiamidato no iónico.

35 En aún una realización adicional, un análogo nucleotídico o equivalente de la invención comprende una sustitución de al menos uno de los oxígenos que no están formando puentes en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente la formación de pares de bases pero añade resistencia significativa a la degradación por nucleasas. Un análogo nucleotídico o equivalente preferido comprende fosforotioato, fosforotioato quiral, fosforoditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, H-fosfonato, metilo y otros alquilfosfonatos incluyendo 3'-alquilen-fosfonato, 5'-alquilen-fosfonato y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato o boranofosfato.

40 Un análogo de nucleótidos preferido adicional o equivalente de la invención comprende uno o más restos de azúcar que están mono- o di-sustituídos en la posición 2', 3' y/o 5' tal como con un -OH; un -F; un alquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alqueno



(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alquinilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alcarilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), arilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), o aralquilo (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), inferior, lineal o ramificado, sustituido o no sustituido, que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos; un O-, S- o N-alquilo; un O-, S-, o N-alquenilo; un O-, S-, o N-alquinilo; un O-, S- o N-alilo; un O-alquil-O-alquilo; un -metoxi; un -aminopropoxi; un aminoxi; un metoxietoxi; un -dimetolaminooxietoxi; y un dimetilaminoetoxietoxi. El resto azúcar puede ser una piranosa o derivado de la misma, o una desoxipiranosa o derivado de la misma, preferentemente una ribosa o un derivado de la misma, o desoxirribosa o derivado de la misma. Tales restos de azúcar derivatizados preferidos comprenden Ácido Nucleico Bloqueado (LNA) en el que el átomo de carbono 2' está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando de este modo un resto de azúcar bicíclico. Un LNA preferido comprende ácido nucleico provisto de puentes de 2'-O,4'-C-etileno (Morita et al. 2001. Nucleic Acid Res Suplemento N.º: 1: 241-242). Estas sustituciones vuelven al análogo nucleotídico o equivalente resistente a RNasa H y resistente a nucleasas e incrementan la afinidad por el ARN objetivo.

Se entiende por una persona experta que no es necesario para todas las posiciones en un oligonucleótido antisentido modificarse uniformemente. Además, más de uno de los análogos o equivalentes mencionados anteriormente se puede incorporar en un oligonucleótido antisentido individual o incluso en una posición individual en un oligonucleótido antisentido. En ciertas realizaciones, un oligonucleótido antisentido de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes.

Un oligonucleótido antisentido preferido de acuerdo con la invención comprende un oligonucleótido antisentido 2'-O-alquifosforotioato, 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.

Un oligonucleótido antisentido muy preferido de acuerdo con la invención comprende una ribosa 2'-O-metil-fosforotioato.

Un equivalente funcional de una molécula de la invención se puede definir como un oligonucleótido según se define en el presente documento en el que una actividad de dicho equivalente funcional se mantiene al menos en algún grado. Preferentemente, una actividad de dicho equivalente funcional es inducir salto del exón 45 y proporcionar una proteína distrofina funcional. Dicha actividad de dicho equivalente funcional se evalúa preferentemente por lo tanto por detección de salto del exón 45 y cuantificando la cantidad de una proteína distrofina funcional. Una distrofina funcional se define preferentemente en el presente documento como que es una distrofina capaz de unir actina y miembros del complejo proteico DGC. La valoración de dicha actividad de un oligonucleótido se hace preferentemente por RT-PCR o por análisis de inmunofluorescencia o de prueba de bandas de Western. Dicha actividad se mantiene preferentemente al menos en algún grado cuando ella representa al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 % o al menos el 80 % o al menos el 90 % o al menos el 95 % o más de la actividad correspondiente de dicho oligonucleótido del que deriva el equivalente funcional. A lo largo de esta memoria descriptiva, cuando la palabra oligonucleótido se usa se puede reemplazar por un equivalente funcional del mismo según se define en el presente documento.

Se entenderá también por una persona experta que oligonucleótidos antisentido distintos se pueden combinar para el salto de manera eficaz del exón 45 del pre-ARNm de DMD humano. En una realización preferida, una combinación de al menos dos oligonucleótidos antisentido se usa en un procedimiento de la invención, tal como dos oligonucleótidos antisentido distintos, tres oligonucleótidos antisentido distintos, cuatro oligonucleótidos antisentido distintos, o cinco oligonucleótidos antisentido distintos o incluso más. También está abarcado por la presente divulgación combinar varios oligonucleótidos o moléculas como se representan en la tabla 1 salvo SEC ID N.º: 68.

Un oligonucleótido antisentido puede unirse a un resto que potencia la captación del oligonucleótido antisentido en células, preferentemente células miogénicas o células musculares. Ejemplos de tales restos son colesterolos, carbohidratos, vitaminas, biotina, lípidos, fosfolípidos, péptidos de penetración celular que incluyen pero no están limitados a antennapedia, TAT, transportano y aminoácidos cargados positivamente tales como oligoarginina, poliarginina, oligolisina o polilisina, dominios de unión a antígenos tales como proporcionados por un anticuerpo, un fragmento Fab de un anticuerpo, o un dominio de unión a antígenos de cadena única tal como un dominio de unión a antígenos de cadena única de camélidos.

Un oligonucleótido antisentido preferido comprende un PMO unido a péptido.

Un oligonucleótido antisentido preferido que comprende uno o más análogos nucleotídicos o equivalentes de la invención modula el ajuste en una o más células musculares, incluyendo células musculares cardíacas, tras administración sistémica. A este respecto, la administración sistémica de un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo nucleotídico o equivalente específico podría resultar en marcar como objetivo un subconjunto de células musculares, mientras que un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo nucleotídico distinto da como resultado el marcado como objetivo de un subgrupo diferente de células musculares. Por lo tanto, en una realización se prefiere usar una combinación de oligonucleótidos antisentido que comprende diferentes análogos nucleotídicos o equivalentes para modular el salto de exón 45 del pre-ARNm de DMD humano.

Una célula puede proveerse con una molécula capaz de interferir con secuencias esenciales que dan como resultado el salto altamente eficiente de exón 45 del pre-ARNm de DMD humano por expresión oligonucleotídica antisentido

- derivada de plásmidos o por expresión vírica proporcionada por un vector basado en virus. Un vector basado en virus tal comprende un casete de expresión que dirige la expresión de un oligonucleótido antisentido según se define en el presente documento. Vectores basados en virus preferidos incluyen vectores basados en adenovirus o vectores basados en virus adenoasociados. La expresión se dirige preferentemente por un promotor de polimerasa III, tal como un promotor de ARN U1, un promotor de ARN U6, o un promotor de ARN U7. Una célula muscular o miogénica se puede proporcionar con un plásmido para expresión oligonucleotídica antisentido proporcionando el plásmido en una solución acuosa. Alternativamente, se puede proporcionar un plásmido por transfección usando agentes de transfección conocidos tales como, por ejemplo, LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) o polietilenimida (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), o derivados de los mismos.
- 5 Un sistema de expresión de oligonucleótidos antisentido preferido es un vector basado en virus asociados a adenovirus (AAV). Se han desarrollado vectores basados en AAV de cadena única y de cadena doble que se pueden usar para expresión prolongada de secuencias nucleotídicas antisentido pequeñas para el salto altamente eficiente del exón 45 del pre-ARNm de DMD.
- 10 Un vector basado en AAV preferido comprende un casete de expresión que está dirigido por un promotor de la polimerasa III (Pol III). Un promotor Pol III preferido es, por ejemplo, un promotor de ARN U1, un promotor de ARN U6, o un promotor de ARN U7.
- 15 La invención por lo tanto proporciona también un vector basado en virus, que comprende un casete de expresión dirigido por promotor Pol III para expresión de una o más secuencias antisentido de la invención para inducir el salto del exón 45 del pre-ARNm de DMD humano.
- 20 **Composición farmacéutica**
- Si se requiere, un oligonucleótido antisentido de la invención o un vector que expresa un oligonucleótido antisentido de la invención se puede incorporar en una mezcla o composición farmacéuticamente activa añadiendo un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una composición, preferentemente una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la invención, y/o un vector basado en virus que expresa las secuencia(s) antisentido de acuerdo con la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- Una composición farmacéutica preferida comprende una molécula según se define en el presente documento y/o un vector según se define en el presente documento y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, combinado opcionalmente con un oligonucleótido antisentido y/o un vector que es capaz de modular el salto del exón 7, 44, 46, 51, 53, 59, 67 del pre-ARNm de DMD.
- 30 Los excipientes preferidos incluyen excipientes capaces de formar complejos, vesículas y/o liposomas que administran un molécula según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido que forma un complejo o atrapado en una vesícula o liposoma por una membrana celular. Se conocen en la técnica muchos de estos excipientes. Los excipientes adecuados comprenden polietilenimina y derivados, o polímeros catiónicos similares, incluyendo copolímeros de polipropilenimina o polietilenimina (PEC) y derivados, anfífilos sintéticos, lipofectina™, DOTAP y/o proteínas de cápsides víricas que son capaces de autoensamblaje en partículas que pueden administrar tal molécula, preferentemente un oligonucleótido según se define en el presente documento a una célula, preferentemente a una célula muscular. Se ha demostrado que tales excipientes administran de forma eficaz ácidos nucleicos (oligonucleótidos tales como antisentido) a una amplia diversidad de células cultivadas, incluyendo células musculares. Los autores de la invención han obtenido resultados muy buenos usando polietilenimina (PEI, ExGen500, MBI Fermentas) como se muestra en el ejemplo. Su potencial de transfección alto se combina con una toxicidad de baja a moderada exenta en términos de supervivencia celular general. La facilidad de modificación estructural se puede usar para permitir modificaciones adicionales y el análisis de sus características de transferencia de ácidos nucleicos (*in vivo*) adicionales y de su toxicidad adicional.
- 35 La lipofectina representa un ejemplo de agente de transfección liposomal. Consiste en dos componentes lipídicos, un lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (cp. DOTAP que es la sal metilsulfato) y un lípido neutro dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro media la liberación intracelular. Otro grupo de sistemas de administración son nanopartículas poliméricas.
- 45 Policationes tales como dietilaminoetilaminoetil (DEAE)-dextrano, que se conoce bien como reactivo de transfección de ADN puede combinarse con cianoacrilato de butilo (PBCA) y cianoacrilato de hexilo (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden administrar una molécula o un compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido a través de las membranas celulares dentro de las células.
- 50 Además de estos materiales de nanopartículas comunes, el péptido catiónico protamina ofrece una aproximación alternativa para formular un compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido como coloides. Este sistema de nanopartículas coloidal puede formar los así llamados proticles, que se pueden preparar por un simple procedimiento de autoensamblaje para empaquetar un oligonucleótido antisentido y mediar liberación intracelular de compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un
- 55

oligonucleótido. La persona experta puede seleccionar y adaptar cualquiera de los excipientes anteriores u otros excipientes y sistemas de administración alternativos comercialmente disponibles para empaquetar y administrar un compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido para su uso en la invención actual para administrar dicho compuesto para el tratamiento de Distrofia Muscular de Duchenne en seres humanos.

- 5 Además, un compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido podría unirse covalentemente o no covalentemente a un ligando objetivo específicamente diseñado para facilitar la captación dentro de la célula, dentro del citoplasma y/o de su núcleo. Tal ligando podría comprender (i) un compuesto (incluyendo pero no limitado a estructuras peptídicas (o estructuras similares a las peptídicas)) que reconoce elementos celulares, tisulares o de órganos que facilita la captación celular y/o (ii) un compuesto químico capaz de facilitar la captación dentro de las células y/o la liberación intracelular de un compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido a partir de vesículas, por ejemplo endosomas o lisosomas.

- 10 Por lo tanto, en una realización preferida, se formula un compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido en un medicamento que se proporciona con al menos un excipiente y/o un ligando que dirige a objetivo para administración y/o con un dispositivo de administración de dicho compuesto a una célula y/o que potencia su administración intracelular. De acuerdo con ello, la invención también comprende una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto según se define en el presente documento, preferentemente un oligonucleótido y que comprende adicionalmente al menos un excipiente y/o un ligando que dirige a objetivo para administración y/o un dispositivo de administración de dicho compuesto a una célula y/o que potencia su administración intracelular.

- 15 Se entiende que una molécula o compuesto u oligonucleótido puede no estar formulado en una composición o preparación individual. Dependiendo de su identidad, la persona experta conocerá que tipo de formulación es la más apropiada para cada compuesto.

- 20 En una realización preferida, se usa una concentración *in vitro* de una molécula o un oligonucleótido según se define en el presente documento, que está oscilando entre 0,1 nM y 1  $\mu$ M. Más preferentemente, la concentración usada está oscilando entre 0,3 a 400 nM, incluso más preferentemente entre 1 a 200 nM. Molécula o un oligonucleótido según se define en el presente documento se puede usar a una dosis que está oscilando entre 0,1 y 20 mg/kg, preferentemente 0,5 y 10 mg/kg. Si se usan varias moléculas u oligonucleótidos, estas concentraciones pueden referirse a la concentración total de oligonucleótidos o a la concentración de cada oligonucleótido añadido. Los intervalos de concentración de oligonucleótido(s) como se dan anteriormente son concentraciones preferidas para usos *in vitro* o *ex vivo*. La persona experta entenderá que dependiendo del/de los oligonucleótido(s) usado(s), de la célula objetivo a tratarse, del objetivo génico y de sus niveles de expresión, del medio usado y de las condiciones de transfección y de incubación, la concentración de oligonucleótido(s) usada puede variar adicionalmente y puede necesitar optimizarse algo adicionalmente.

- 25 Más preferentemente, un compuesto preferentemente un oligonucleótido y un compuesto adjunto a usarse en la invención para evitar, tratar DMD se producen de forma sintética y se administran directamente a una célula, un tejido, un órgano y/o pacientes en forma de formulación en una composición o preparación farmacéuticamente aceptable. La administración de una composición farmacéutica al sujeto se lleva a cabo preferentemente por una o más inyecciones parenterales, por ejemplo administraciones intravenosa y/o subcutánea y/o intramuscular y/o intratecal y/o intraventricular, preferentemente inyecciones, en uno o en múltiples sitios en el cuerpo humano.

#### 40 **Uso**

- En aún un aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un oligonucleótido antisentido o molécula de acuerdo con la invención, y/o un vector basado en virus que expresa una o más secuencias antisentido de acuerdo con la invención y/o una composición farmacéutica, para inducir y/o promover el ajuste del pre-ARNm de DMD, para el tratamiento de DMD. El ajuste está modulado preferentemente en una célula miogénica humana o en una célula muscular *in vitro*. Es más preferido que el ajuste esté modulado en una célula miogénica humana o en una célula muscular humana *in vitro*.

- 45 En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprende" y sus conjugaciones se usan en sentido no limitativo para significar que los elementos después de la palabra están incluidos, pero los elementos no mencionados específicamente no están excluidos. Además el verbo "consistir" se puede reemplazar por "consistir esencialmente en" significando que una molécula o un vector basado en virus o una composición según se define en el presente documento pueden comprender componente(s) adicional(es) a los identificados específicamente, no alterando dicho(s) componente(s) adicional(es) la característica única de la invención. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de un elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una" significa normalmente así "al menos uno".

- 50 Los siguientes ejemplos se ofrecen solo para propósitos ilustrativos y no están destinados a limitar el ámbito de la presente invención en modo alguno.

#### **Leyendas de la figura**

**Figura 1.** En los miotubos de control humanos, una serie de AON (PS220 a PS225; SEC ID N.<sup>o</sup>: 3 a 8), todos uniéndose a un tramo continuo de al menos 21 nucleótidos dentro de una secuencia específica del exón 45 (es decir SEC ID N.<sup>o</sup>: 2), se pusieron a prueba a dos concentraciones diferentes (200 y 500 nM). Todos los seis AON fueron eficaces en inducir el salto específico del exón 45, como se confirma por análisis de secuencia (no mostrado). PS220 (SEC ID N.<sup>o</sup>: 3) sin embargo, indujo de forma reproducible los niveles más altos de salto del exón 45 (véase Fig. 2). (NT: células no tratadas, M: marcador de tamaño).

**Figura 2.** En los miotubos de control de seres humanos, se puso a prueba PS220 25-mero (SEC ID N.<sup>o</sup>: 3) a concentración creciente. Se observaron niveles de salto del exón 45 de hasta el 75 % (a 400 nM) de forma reproducible, como se valora por Análisis de Agilent LabChip.

**Figura 3.** En miotubos control humanos, las eficiencias de un AON45-5 17-mero "corto" (SEC ID N.<sup>o</sup>: 68) y de su homólogo PS220 25-mero "largo" solapante se compararon directamente a 200 nM y 500 nM. PS220 fue marcadamente más eficiente a ambas concentraciones: al 63 % cuando se compara con al 3 % obtenido con 45-5. (NT: células no tratadas, M: marcador de tamaño).

## Ejemplos

### Ejemplos 1 y 2

#### Materiales y procedimientos

El diseño de AON estaba basado en estructuras secundarias abiertas (parcialmente) solapantes del ARN de exón objetivo como se predijo por el programa m-fold (Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3406-3415) y estaba basado en sitios de unión a proteína SR teóricos (parcialmente) solapantes como se predijo por numerosos programas de software tales como ESEfinder (Cartegni, L. et al. (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.*, 31, 3568-71; Smith, P. J. et al. (2006) An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum. Mol. Genet.*, 15, 2490-2508) que predice sitios de unión para las cuatro proteínas SR más abundantes (SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55). AON se sintetizaron por Prosensa Therapeutics B.V. (Leiden, Países Bajos) y contienen 2'-O-metil ARN y armazones de fosforotioato (PS) de longitud total.

#### Cultivo de tejidos, transfección y análisis por RT-PCR

Los cultivos de miotubos derivados de un individuo saludable ("ser humano control") se obtuvieron como se describe anteriormente (Aartsma-Rus et al. *Hum Mol Genet* 2003; 12(8): 907-14). Para el rastreo de los AON, se transfectaron los cultivos de miotubos con 0 a 500 nM de cada AON. El reactivo de transfección polietilenoimina (PEI, ExGen500 MBI Fermentas) se usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con 2 µl de PEI por µg de AON. Las eficacias de salto del exón se determinaron por análisis de RT-PCR anidada usando cebadores en los exones que flanquean el exón 45. Se aislaron fragmentos de PCR a partir de geles de agarosa para verificación de secuencia. Para cuantificación, los productos de PCR se analizaron usando el kit Agilent DNA 1000 LabChip y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, EE.UU.).

## Resultados

Una serie de secuencias dirigidas a objetivo de AON dentro de SEC ID N.<sup>o</sup>: 2 dentro del exón 45 se diseñaron y se pusieron a prueba en cultivos de miotubos normales, por transfección y RT-PCR subsiguiente y análisis de secuencia de ARN aislado subsiguiente. PS220 (SEC ID N.<sup>o</sup>: 3) indujo reproduciblemente niveles más altos de salto del exón 45, cuando se comparó con PS221-PS225 (Figura 1). Niveles altos de salto del exón 45 de hasta el 75 % se obtuvieron ya a PS220 400 nM (Figura 2). En una comparación directa, PS220 (un 25-mero) fue de forma reproducible más eficiente en inducir el salto del exón 45 que su homólogo 17-mero más corto AON 45-5 (SEC ID N.<sup>o</sup>: 68; anteriormente publicado como h45AON5 (Aartsma-Rus et al. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 83-92)), tanto a concentraciones de AON de 200 nM como de 500 nM y con el 63 % frente al 3% respectivamente a 500 nM (Figura 3). Este resultado se debe probablemente al hecho de que la longitud prolongada de PS220, de hecho solapando completamente AON 45-5, incrementa la energía libre del complejo AON-objetivo de tal forma que también se incrementa la eficacia de inducir el salto del exón 45.



(continuación)

SEC ID N.º: 29	CCCAGUUGCAUUCAAUGUUUCUGACA	SEC ID N.º: 62	UGCCCGCUGCCCCAAUGCCCAUCCUUGGA
SEC ID N.º: 30	CCAGUUGCAUUCAAUGUUUCUGACAA	SEC ID N.º: 63	GCCGCGUGCCCCAAUGCCCAUCCUGGAG
SEC ID N.º: 31	CAGUUGCAUUCAAUGUUUCUGACAAC	SEC ID N.º: 64	CCGCGUGCCCCAAUGCCCAUCCUGGAGU
SEC ID N.º: 32	AGUUGCAUUCAAUGUUUCUGACAACA	SEC ID N.º: 65	CGCUGCCCCAAUGCCCAUCCUGGAGUU
SEC ID N.º: 33	UCC UGU AGA AUA CUG GCA UC	SEC ID N.º: 66	UGU UUU UGA GGA UUG CUG AA
SEC ID N.º: 34	<b>UGC AGA CCU CCU GCC ACC GCA GAU UCA</b>	SEC ID N.º: 67	<b>UGUUCUGACAACAGUUUGCCCGCUGCCCCAAU GCCAUCCUGG</b>
SEC ID N.º: 35	<b>UUGCAGACCCUCCUGCCACCCGAGAUUC AGGCUUC</b>	SEC ID N.º: 68 (45-5)	GCCCAAUGCCCAUCCUGG

Tabla 2 AONS en exones 51,53, 7, 44, 46, 59 y 67

<b>Exón 51 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 69	AGAGCAGGUACCUCCAACAUAAGG	SEC ID N.º: 91	UCAAGGAAGAUUGGCAUUUCUAGUUUU
SEC ID N.º: 70	GAGCAGGUACCUCCAACAUAAGGA	SEC ID N.º: 92	UCAAGGAAGAUUGGCAUUUCU
SEC ID N.º: 71	AGCAGGUACCUCCAACAUAAGGAA	SEC ID N.º: 93	CAAGGAAGAUUGGCAUUUCUAGUUUG
SEC ID N.º: 72	GCAGGUACCUCCAACAUAAGGAAG	SEC ID N.º: 94	AAGGAAGAUUGGCAUUUCUAGUUUGG
SEC ID N.º: 73	CAGGUACCUCCAACAUAAGGAAGA	SEC ID N.º: 95	AGGAAGAUUGGCAUUUCUAGUUUGGA
SEC ID N.º: 74	AGGUACCUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 96	GGAAGAUUGGCAUUUCUAGUUUGGAG
SEC ID N.º: 75	GGUACCUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 97	GAAGAUUGGCAUUUCUAGUUUGGAGA
SEC ID N.º: 76	GUACCUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 98	AAGAUUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 77	UACCUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 99	AGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 78	ACCUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 100	GAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 79	CCUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 101	AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 80	CUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 102	UGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 81	CUCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 103	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 82	UCCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 104	GCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 83	CCAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 105	CAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 84	CAACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 106	AUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 85	AACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 107	UUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 86	ACAUAAGGAAGAU	SEC ID N.º: 108	UUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID N.º: 87	ACAUAAGGAAGAU		
SEC ID N.º: 88	ACAUAAGGAAGAU		
SEC ID N.º: 89	CAUAAGGAAGAU		
SEC ID N.º: 90	AUCAAGGAAGAU		
<b>Exón 53 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 109	CCAUUGUGUUGAAUCCUUUAACAUU	SEC ID N.º: 116	CAUCCAACUGUUGCCUCCGUUCUGAAGGUG
SEC ID N.º: 110	CCAUUGUGUUGAAUCCUUUAAC	SEC ID N.º: 117	CUGAAGGUGUUCUUGUACUUCAUCC

(continuación)

<b>Exón 53 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 111	AUIUGUIUGAAUCCJLUAAC	SEC ID N.º: 118	UGUAUAGGGACCCUCCUUCCAUGACUC
SEC ID N.º: 112	CCUGUCCUAAGACCUGCUCA	SEC ID N.º: 119	AUCCACAGUUAUUCUGAALUC
SEC ID N.º: 113	CUUUGGAIUGCAUCUACUGAUAG	SEC ID N.º: 120	UUGGCUCUGGCCUGUCCUAAGA
SEC ID N.º: 114	CAUJCAACUGUUGCCUCCGGUUCUG	SEC ID N.º: 121	AA3ACCUGCUCAGCUUCUUCJUAAGCUUCCAGGCCA
SEC ID N.º: 115	CUGUUGCCUCCGGUJCUGAAGGUG		
<b>Exón 7 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 122	UGCAUGUUCAGUCGUUGUGUGG	SEC ID N.º: 124	AUUUACCAACCUUCAGGAUCCGAGUA
SEC ID N.º: 123	CACUAUCCAGUCAAAUAGGUCUGG	SEC ID N.º: 125	GGCCUAAAACACAUACACAU
<b>Exón 44 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 126	UCAGCUUCUGULAGCCACUG	SEC ID N.º: 151	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID N.º: 127	UUCAGGUUCUGUUAGCCACU	SEC ID N.º: 152	CAGGUUCUGUJAGCCACUGAUUAAA
SEC ID N.º: 128	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID N.º: 153	AGCUUCUGUUAGCCACUGALUAAA
SEC ID N.º: 129	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N.º: 154	AGCUUCUGUUAGCCACUGAU
SEC ID N.º: 130	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N.º: 155	GCUUCUGUJAGCCACUGAUU
SEC ID N.º: 131	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N.º: 156	AGCUUCJGUUAGCCACUGAUU
SEC ID N.º: 132	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID N.º: 157	GCUUCUGUUAGCCACUGAUU
SEC ID N.º: 133	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID N.º: 158	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU
SEC ID N.º: 134	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID N.º: 159	GCUUCUGUJAGCCACUGAUUAA
SEC ID N.º: 135	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N.º: 160	AGCUUCJGUUAGCCACUGAUUAA
SEC ID N.º: 136	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N.º: 161	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID N.º: 137	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N.º: 162	AGCUUCUGUJAGCCACUGAUUAAA
SEC ID N.º: 138	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N.º: 163	GCUUCUGUJAGCCACUGAUUAAA
SEC ID N.º: 139	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N.º: 164	CCAUUUUGAUUUUAGCAUGUUCGCC
SEC ID N.º: 140	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N.º: 165	AGAUACCAUUUGUALUUUAGC
SEC ID N.º: 141	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N.º: 166	GCCAUUUUCUACACAGAUUCU



(continuación)

<b>Exón 44 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 142	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID N.º: 167	GCCAUUUUCUCAACAGAUUCUGUCA
SEC ID N.º: 143	CAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID N.º: 168	AUUCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC
SEC ID N.º: 144	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID N.º: 169	UCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC
SEC ID N.º: 145	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N.º: 170	GUUCAGCUUCUGUUAGCC
SEC ID N.º: 146	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID N.º: 171	CUGAUUAAAUAUCUUUAUUAU C
SEC ID N.º: 147	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N.º: 172	GCCGCCAUUUUCUCAACAG
SEC ID N.º: 148	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID N.º: 173	GUUUUUAGCAUGUUUCCCA
SEC ID N.º: 149	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID N.º: 174	CAGGAAUUUGUGUCUUUC
SEC ID N.º: 150	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA		
<b>Exón 46 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 175	GCUUUUUUUUAGUUUGCUCUUUU	SEC ID N.º: 203	AGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUG
SEC ID N.º: 176	CUUUUCUUUUAGUUUGCUCUUUU	SEC ID N.º: 204	GGUUCAAAGUGGGAUACUAGCAAUGU
SEC ID N.º: 177	UUUUUUUUUUAGUUUGCUCUUUUUC	SEC ID N.º: 205	GUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N.º: 178	UUUUUUUUUUAGUUUGCUCUUUUUCC	SEC ID N.º: 206	UUCAAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUA
SEC ID N.º: 179	UUCUUUUUUAGUUUGCUCUUUUUCCA	SEC ID N.º: 207	UCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAU
SEC ID N.º: 180	UCUUUUUUUUAGUUUGCUCUUUUCCAG	SEC ID N.º: 208	CAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUC
SEC ID N.º: 181	CUUUUUUUUUAGUUUGCUCUUUUCCAGG	SEC ID N.º: 209	AAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCU
SEC ID N.º: 182	UUUUUUUUUUAGUUUGCUCUUUUCCAGGU	SEC ID N.º: 210	AGUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUG
SEC ID N.º: 183	UUUAGUUUGCUCUUUUCCAGGUU	SEC ID N.º: 211	GUGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGC
SEC ID N.º: 184	UUAGUUUGCUCUUUUCCAGGUUC	SEC ID N.º: 212	UGGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGCU
SEC ID N.º: 185	UAGUUUGCUCUUUUCCAGGUUCA	SEC ID N.º: 213	GGGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGUUU
SEC ID N.º: 186	AGUUUGCUCUUUUCCAGGUUCA	SEC ID N.º: 214	GGAUACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUC
SEC ID N.º: 187	GUUGCUCUCUUUUCCAGGUUCAAG	SEC ID N.º: 215	GAUACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCC
SEC ID N.º: 188	UUUGCUCUCUUUUCCAGGUUCAAGU	SEC ID N.º: 216	AUACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCCU
SEC ID N.º: 189	UGCUCUCUUUUCCAGGUUCAAGUG	SEC ID N.º: 217	UACUAGCAAUGUUUAUCUGCUUCCUC

(continuación)

<b>Exón 46 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 190	GCUGCUCUUUCCAGGUUCAAGUGG	SEC ID N.º: 218	ACUAGCAAUGUUUUCUGCUUCCUCC
SEC ID N.º: 191	CUGCUCUUUCCAGGUUCAAGUGG	SEC ID N.º: 219	CUAGCAAUGUUUUCUGCUUCCUCCA
SEC ID N.º: 192	UGCUCUUUCCAGGUUCAAGUGGA	SEC ID N.º: 220	UAGCAAUGUUUUCUGCUUCCUCAA
SEC ID N.º: 193	GCUCUUUCCAGGUUCAAGUGGAC	SEC ID N.º: 221	AGCAAUGUUUUCUGCUUCCUCCAAC
SEC ID N.º: 194	CUCUUUCCAGGUUCAAGUGGUAU	SEC ID N.º: 222	GCAAUGUUUUCUGCUUCCUCCAACC
SEC ID N.º: 195	UCUUUCCAGGUUCAAGUGGUAUC	SEC ID N.º: 223	CAAUGUUUUCUGCUUCCUCCAACCA
SEC ID N.º: 196	CUUUUCCAGGUUCAAGUGGUAUCU	SEC ID N.º: 224	AAUGUUUUCUGCUUCCUCCAACCAU
SEC ID N.º: 197	UUUUUCCAGGUUCAAGUGGUAUCUA	SEC ID N.º: 225	AUGUUUUCUGCUUCCUCCAACCAUA
SEC ID N.º: 198	UUUCCAGGUUCAAGUGGUAUCUAG	SEC ID N.º: 226	UGUUUUCUGCUUCCUCCAACCAUAA
SEC ID N.º: 199	UUCAGGUUCAAGUGGUAUCUAGC	SEC ID N.º: 227	GUUUUUCUGCUUCCUCCAACCAUAAA
SEC ID N.º: 200	UCCAGGUUCAAGUGGUAUCUAGCA	SEC ID N.º: 228	GCUGCUCUUUCCAGGUUC
SEC ID N.º: 201	CCAGGUUCAAGUGGUAUCUAGCAA	SEC ID N.º: 229	UCUUUCCAGGUUCAAGUGG
SEC ID N.º: 202	CAGGUUCAAGUGGUAUCUAGCAAU	SEC ID N.º: 230	AGGUUCAAGUGGUAUCUA
<b>Exón 59 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 231	CAAUUUUCCCACUCAGUAUU	SEC ID N.º: 233	UCCUCAGGAGGCAGCUCUAAA
SEC ID N.º: 232	UUGAAGUCCUGGAGUCUU		
<b>Exón 67 del gen DMD</b>			
SEC ID N.º: 234	GCUCUGGUCACAAAUCUGUUGAAC	SEC ID N.º: 236	GGUGAAUAACUUACAAAUUUGGAAGC
SEC ID N.º: 235	CACUUGCUUGAAAAGGUCUACAAAGGA		

**Listado de secuencias**

- <110> Academisch ziekenhuis Leiden
- Prosensa B.V.
- Prosensa Holding B.v.
- 5 Prosensa Technologies B.v.
- <120> Procedimientos y medios para el salto eficiente del exón 45 en el pre-ARNm de DMD
- <130> P6024691PCT
- <150> PCT/JP2007/50673
- <151> 27/10/2008
- 10 <160> 236
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 3685
- <212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 562 658 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  
 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

ES 2 562 658 T3

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  
 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

ES 2 562 658 T3

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  
 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				
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				

ES 2 562 658 T3

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  
 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



ES 2 562 658 T3

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  
 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  
 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			
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
	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  
 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  
 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

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

ES 2 562 658 T3

2810						2815						2820
Lys	Asp 2825	Asp	Glu	Leu	Ser	Arg 2830	Gln	Ala	Pro	Ile	Gly 2835	Gly Asp Phe
Pro	Ala 2840	Val	Gln	Lys	Gln	Asn 2845	Asp	Val	His	Arg	Ala 2850	Phe Lys Arg
Glu	Leu 2855	Lys	Thr	Lys	Glu	Pro 2860	Val	Ile	Met	Ser	Thr 2865	Leu Glu Thr
Val	Arg 2870	Ile	Phe	Leu	Thr	Glu 2875	Gln	Pro	Leu	Glu	Gly 2880	Leu Glu Lys
Leu	Tyr 2885	Gln	Glu	Pro	Arg	Glu 2890	Leu	Pro	Pro	Glu	Glu 2895	Arg Ala Gln
Asn	Val 2900	Thr	Arg	Leu	Leu	Arg 2905	Lys	Gln	Ala	Glu	Glu 2910	Val Asn Thr
Glu	Trp 2915	Glu	Lys	Leu	Asn	Leu 2920	His	Ser	Ala	Asp	Trp 2925	Gln Arg Lys
Ile	Asp 2930	Glu	Thr	Leu	Glu	Arg 2935	Leu	Gln	Glu	Leu	Gln 2940	Glu Ala Thr
Asp	Glu 2945	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu 2950	Arg	Gln	Ala	Glu	Val 2955	Ile Lys Gly
Ser	Trp 2960	Gln	Pro	Val	Gly	Asp 2965	Leu	Leu	Ile	Asp	Ser 2970	Leu Gln Asp
His	Leu 2975	Glu	Lys	Val	Lys	Ala 2980	Leu	Arg	Gly	Glu	Ile 2985	Ala Pro Leu
Lys	Glu 2990	Asn	Val	Ser	His	Val 2995	Asn	Asp	Leu	Ala	Arg 3000	Gln Leu Thr
Thr	Leu 3005	Gly	Ile	Gln	Leu	Ser 3010	Pro	Tyr	Asn	Leu	Ser 3015	Thr Leu Glu
Asp	Leu 3020	Asn	Thr	Arg	Trp	Lys 3025	Leu	Leu	Gln	Val	Ala 3030	Val Glu Asp
Arg	Val 3035	Arg	Gln	Leu	His	Glu 3040	Ala	His	Arg	Asp	Phe 3045	Gly Pro Ala
Ser	Gln 3050	His	Phe	Leu	Ser	Thr 3055	Ser	Val	Gln	Gly	Pro 3060	Trp Glu Arg
Ala	Ile 3065	Ser	Pro	Asn	Lys	Val 3070	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asn 3075	His Glu Thr

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  
 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  
 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

ES 2 562 658 T3

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

<210> 2

<211> 75

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> exón

<400> 2

**ccaggauggc auugggcagc ggcaaacugu ugucagaaca uugaaugcaa cuggggaaga 60**  
**aaauuucag caauc 75**

10 <210> 3

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido

<400> 2

uuugccgcug cccaugcca uccug 25

<210> 4

<211> 25

20 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 4

auucaauguu cugacaacag uugc 25

5 <210> 5

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

10 <223> oligonucleótido

<400> 5

ccaguugcau ucaauguucu gacaa 25

<210> 6

<211> 22

15 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 6

20 caguugcauu caauguucug ac 22

<210> 7

<211> 20

<212> ARN

<213> artificial

25 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 7

aguugcauuc aauguucuga 20

<210> 8

30 <211> 21

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

35 <400> 8

gauugcugaa uuauuucuc c 21

<210> 9

<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
5 <223> oligonucleótido  
<400> 9  
gauugcugaa uuauuucuuc cccag 25  
<210> 10  
<211> 25  
10 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 10  
15 auugcugaau uauuucuucc ccagu 25  
<210> 11  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
20 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 11  
uugcugaauu auuucuuccc caguu 25  
<210> 12  
25 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
30 <400> 12  
ugcugaauua uuucuucccc aguug 25  
<210> 13  
<211> 25  
<212> ARN  
35 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

<400> 13  
gcugaauuau uucuucccca guugc 25  
<210> 14  
<211> 25  
5 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 14  
10 cugaauuaauu ucuuccccag uugca 25  
<210> 15  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
15 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 15  
ugaauuauuu cuuccccagu ugcau 25  
<210> 16  
20 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
25 <400> 16  
gaauuauuc uuccccaguu gcauu 25  
<210> 17  
<211> 25  
<212> ARN  
30 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 17  
aauuauuucu uucccaguug cauuc 25  
35 <210> 18  
<211> 25  
<212> ARN

<213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 18  
 5 auuauuucu cccaguugc auca 25  
 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 10 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 19  
 uuauuucuucc ccaguugca uucaa 25  
 <210> 20  
 15 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 20 <400> 20  
 uauuucuucc ccaguugcau ucaau 25  
 <210> 21  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 25 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 21  
 auuucuucc caguugcau caaug 25  
 30 <210> 22  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 35 <223> oligonucleótido  
 <400> 22  
 uuucuuccc aguugcauuc aaugu 25

<210> 23  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
5 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 23  
ucuuccccag uugcaucaaa uguuc 25  
<210> 24  
10 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
15 <400> 24  
ucuuccccag ugcauucuu uguuc 25  
<210> 25  
<211> 25  
<212> ARN  
20 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 25  
cuuccccagu ugcauucuuuu guuc 25  
25 <210> 26  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
30 <223> oligonucleótido  
<400> 26  
uuccccaguu gcauucuuuu guuc 25  
<210> 27  
<211> 25  
35 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>

<223> oligonucleótido  
<400> 27  
uccccaguug cauucaaugu ucuga 25  
<210> 28  
5 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
10 <400> 28  
cccaguugc auucaauguu cugac 25  
<210> 29  
<211> 25  
<212> ARN  
15 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 29  
ccaguugca uucaauguuc ugaca 25  
20 <210> 30  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
25 <223> oligonucleótido  
<400> 30  
ccaguugcau ucaauguucu gacaa 25  
<210> 31  
<211> 25  
30 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 31  
35 caguugcauu caauguucug acaac 25  
<210> 32  
<211> 25



- <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido
- 5 <400> 32  
aguugcauuc aaguucuga caaca 25  
<210> 33  
<211> 20  
<212> ARN
- 10 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 33  
uccuguagaa uacuggcauc 20
- 15 <210> 34  
<211> 27  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>
- 20 <223> oligonucleótido  
<400> 34  
ugcagaccuc cugccaccgc agauuca 27  
<210> 35  
<211> 34
- 25 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 35
- 30 uugcagaccu ccugccaccg cagauucagg cuuc 34  
<210> 36  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial
- 35 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 36

guugcauuca auguucugac aacag 25

<210> 37

<211> 25

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 37

uugcauucaa uguucugaca acagu 25

10 <210> 38

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido

<400> 38

ugcauucaau guucugaca caguu 25

<210> 39

<211> 25

20 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 39

25 gcauucaaug uucugacaac aguuu 25

<210> 40

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 40

cauucaaugu ucugacaaca guuug 25

<210> 41

35 <211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 41

auucaauguu cugacaacag uuugc 25

5 <210> 42

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

10 <223> oligonucleótido

<400> 42

ucaauguucu gacaacaguu ugccg 25

<210> 43

<211> 25

15 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 43

20 caauguucug acaacaguuu gccgc 25

<210> 44

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

25 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 44

aauguucuga caacaguuug ccgcu 25

<210> 45

30 <211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

35 <400> 45

auguucugac aacaguuugc cgugc 25

<210> 46

<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
5 <223> oligonucleótido  
<400> 46  
uguucugaca acaguugcc gcugc 25  
<210> 47  
<211> 25  
10 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 47  
15 guucugacaa caguugccg cugcc 25  
<210> 48  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
20 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 48  
uucugacaac aguuugccgc ugccc 25  
<210> 49  
25 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
30 <400> 49  
ucugacaaca guuuugccgcu gccca 25  
<210> 50  
<211> 25  
<212> ARN  
35 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

<400> 50  
cugacaacag uuugccgcug ccaa 25  
<210> 51  
<211> 25  
5 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 51  
10 ugacaacagu uugccgcugc ccaau 25  
<210> 52  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
15 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 52  
gacaacaguu ugccgcugcc caaug 25  
<210> 53  
20 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
25 <400> 53  
acaacaguuu gccgcugccc aaugc 25  
<210> 54  
<211> 25  
<212> ARN  
30 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 54  
caacaguuug ccgcugccca augcc 25  
35 <210> 55  
<211> 25  
<212> ARN

<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 55  
5 aacaguuugc gcgugcccaa ugcca 25  
<210> 56  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
10 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 56  
acaguuugcc gcugcccaau gccau 25  
<210> 57  
15 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
20 <400> 57  
caguuugccg cugcccaaug ccauc 25  
<210> 58  
<211> 25  
<212> ARN  
25 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 58  
aguugccgc ugcccaaugc caucc 25  
30 <210> 59  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
35 <223> oligonucleótido  
<400> 59  
guuugccgc gcccaaugcc auccu 25

<210> 60  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
5 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 60  
uuugccgcug cccaugcca uccug 25  
<210> 61  
10 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
15 <400> 61  
uugccgcugc ccaaugccau ccugg 25  
<210> 62  
<211> 25  
<212> ARN  
20 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 62  
ugccgcugcc caaugccauc cugga 25  
25 <210> 63  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
30 <223> oligonucleótido  
<400> 63  
gccgcugccc aaugccauc uggag 25  
<210> 64  
<211> 25  
35 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>

<223> oligonucleótido  
<400> 64  
ccgugccca augccauccu ggagu 25  
<210> 65  
5 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
10 <400> 65  
cgcugcccaa ugccauccug gaguu 25  
<210> 66  
<211> 20  
<212> ARN  
15 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 66  
uguuuuugag gauugcugaa 20  
20 <210> 67  
<211> 40  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
25 <223> oligonucleótido  
<400> 67  
uguucugaca acaguuugcc gcugcccaau gccauccugg gccauccugg 40  
<210> 68  
<211> 17  
30 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 68  
35 gcccaaugcc auccugg 17  
<210> 69  
<211> 25



<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
5 <400> 69  
agagcaggua ccuccaacauc caagg 25  
<210> 70  
<211> 25  
<212> ARN  
10 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 70  
gagcagguac cuccaacauc aagga 25  
15 <210> 71  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
20 <223> oligonucleótido  
<400> 71  
agcagguacc uccaacaucaggaa 25  
<210> 72  
<211> 25  
25 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 72  
30 gcagguaccu ccaacaucaggaa 25  
<210> 73  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
35 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 73

caggucccuc caacaucaag gaaga 25

<210> 74

<211> 25

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 74

agguaccucc aacuacaagg aagau 25

10 <210> 75

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido

<400> 75

gguaccucca acaucaagga agaug 25

<210> 76

<211> 25

20 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 76

25 guaccuccaa caucaaggaa gaugg 25

<210> 77

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 77

uaccuccac aucaaggaag auggc 25

<210> 78

35 <211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 78  
accuccaaca ucaaggaaga uggca 25

5 <210> 79  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>

10 <223> oligonucleótido  
<400> 79  
ccuccaacau caaggaagau ggcau 25  
<210> 80  
<211> 25

15 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 80

20 cuccaacauc aaggaagau gcauu 25  
<210> 81  
<211> 30  
<212> ARN  
<213> artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 81  
cuccaacauc aaggaagau gcauuucuag 30  
<210> 82

30 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

35 <400> 82  
uccaacauca aggaagau gcauuu 25  
<210> 83

<211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 5 <223> oligonucleótido  
 <400> 83  
 ccaacaucaaggaaggauggc auuuc 25  
 <210> 84  
 <211> 25  
 10 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 84  
 15 caacaucaag gaagauggca uuucu 25  
 <210> 85  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 20 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 85  
 aacaucaagg aagauggcau uucua 25  
 <210> 86  
 25 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 30 <400> 86  
 acaucaagga agauggcauu ucuag 25  
 <210> 87  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 35 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido

<400> 87  
acaucaagga agauggcauu ucuaguuugg 30  
<210> 88  
<211> 25  
5 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 88  
10 acaucaagga agauggcauu ucuag 25  
<210> 89  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
15 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 89  
caucaaggaa gauggcauuu cuagu 25  
<210> 90  
20 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
25 <400> 90  
aucaaggaag auggcauuuc uaguu 25  
<210> 91  
<211> 25  
<212> ARN  
30 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 91  
ucaaggaaga uggcauuucu aguuu 25  
35 <210> 92  
<211> 20  
<212> ARN

<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 92  
5 ucaaggaaga uggcauuucu 20  
<210> 93  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
10 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 93  
caaggaagau ggcauuucua guuug 25  
<210> 94  
15 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
20 <400> 94  
aaggaagaug gcauuucuag uuugg 25  
<210> 95  
<211> 25  
<212> ARN  
25 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 95  
aggaagaugg cauuucuagu uugga 25  
30 <210> 96  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
35 <223> oligonucleótido  
<400> 96  
ggaagauggc auuucuaguu uggag 25

<210> 97  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
5 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 97  
gaagauggca uuucuaguuu ggaga 25  
<210> 98  
10 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
15 <400> 98  
aagauggcau uucuaguuug gagau 25  
<210> 99  
<211> 25  
<212> ARN  
20 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 99  
agauggcauu ucuaguuugg agaug 25  
25 <210> 100  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
30 <223> oligonucleótido  
<400> 100  
gauggcauuu cuaguuugga gaugg 25  
<210> 101  
<211> 25  
35 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>

<223> oligonucleótido  
<400> 101  
auggcauuuc uaguuggag auggc 25  
<210> 102  
5 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
10 <400> 102  
uggcauuucu aguuuggaga uggca 25  
<210> 103  
<211> 25  
<212> ARN  
15 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 103  
ggcauuucua guuuggagau ggca 25  
20 <210> 104  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
25 <223> oligonucleótido  
<400> 104  
gcuuuuuag uuuggagaug gcagu 25  
<210> 105  
<211> 25  
30 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 105  
35 cauuucuagu uuggagaugg cagu 25  
<210> 106  
<211> 25



<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
5 <400> 106  
auuucuaguu uggagauggc aguuu 25  
<210> 107  
<211> 25  
<212> ARN  
10 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 107  
uuucuaguuu ggagauggca guuuc 25  
15 <210> 108  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
20 <223> oligonucleótido  
<400> 108  
uucuaguuug gagauggcag uuucc 25  
<210> 109  
<211> 25  
25 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 109  
30 ccuuguguu gaaucuuua acuuu 25  
<210> 110  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> artificial  
35 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 110

ccauguguu gaaucuuua ac 22

<210> 111

<211> 20

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 111

auuguguuga auccuuuaac 20

10 <210> 112

<211> 20

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido

<400> 112

ccuguccuaa gaccugcuca 20

<210> 113

<211> 25

20 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 113

25 cuuuuggauu gcaucuacug uauag 25

<210> 114

<211> 20

<212> ARN

<213> artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 114

caucaacug uugccuccgg uucug 25

<210> 115

35 <211> 24

<212> ARN

<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 115  
cuguugccuc cgguucuga ggug 24

5 <210> 116  
<211> 31  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>

10 <223> oligonucleótido  
<400> 116  
cauucacug uugccuccgg uucugaaggu g 31  
<210> 117  
<211> 25

15 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 117

20 cugaaggugu ucuuguacuu caucc 25  
<210> 118  
<211> 27  
<212> ARN  
<213> artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 118  
uguauagga cccuccuucc augacuc 27  
<210> 119

30 <211> 20  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

35 <400> 119  
auccacuga uucugaauc 20  
<210> 120

- <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>
- 5 <223> oligonucleótido  
 <400> 120  
 uuggcucugg ccuguccuaa ga 22  
 <210> 121  
 <211> 35
- 10 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 121
- 15 aagaccugcu cagcuucuuc cuuagcuucc agcca 35  
 <210> 122  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> artificial
- 20 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 122  
 ugcauguucc agucguugug ugg 23  
 <210> 123
- 25 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido
- 30 <400> 123  
 cacuaaucca gucaaaauagg ucugg 25  
 <210> 124  
 <211> 25  
 <212> ARN
- 35 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido

<400> 124  
auuuaccaac cuucaggauc gagua 25  
<210> 125  
<211> 21  
5 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 125  
10 ggccuaaaac acauacacau a 21  
<210> 126  
<211> 20  
<212> ARN  
<213> artificial  
15 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 123  
ucagcuucug uuagccacug 20  
<210> 127  
20 <211> 20  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
25 <400> 127  
uucagcuucu guuagccacu 20  
<210> 128  
<211> 21  
<212> ARN  
30 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 128  
uucagcuucu guuagccacu g 21  
35 <210> 129  
<211> 21  
<212> ARN

<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 129  
5 ucagcuucug uuagccacug a 21  
<210> 130  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> artificial  
10 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 130  
uucagcuucu guuagccacu ga 22  
<210> 131  
15 <211> 21  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
20 <400> 131  
ucagcuucug uuagccacug a 21  
<210> 132  
<211> 22  
<212> ARN  
25 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 132  
uucagcuucu guuagccacu ga 22  
30 <210> 133  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
35 <223> oligonucleótido  
<400> 133  
ucagcuucug uuagccacug au 22

- <210> 134  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> artificial
- 5 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 134  
uucagcuucu guuagccacu gau 23  
<210> 135
- 10 <211> 23  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido
- 15 <400> 135  
ucagcuucug uuagccacug auu 23  
<210> 136  
<211> 24  
<212> ARN
- 20 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 136  
uucagcuucu guuagccacu gauu 24
- 25 <210> 137  
<211> 24  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>
- 30 <223> oligonucleótido  
<400> 137  
ucagcuucug uuagccacug auua 24  
<210> 138  
<211> 24
- 35 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>

<223> oligonucleótido  
<400> 138  
uucagcuucu guuagccacu gaua 24  
<210> 139  
5 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
10 <400> 139  
ucagcuucug uuagccacug auuaa 25  
<210> 140  
<211> 26  
<212> ARN  
15 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 140  
uucagcuucu guuagccacu gauuaa 26  
20 <210> 141  
<211> 26  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
25 <223> oligonucleótido  
<400> 141  
ucagcuucug uuagccacug auuaaa 26  
<210> 142  
<211> 27  
30 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 142  
35 uucagcuucu guuagccacu gauuaaa 27  
<210> 143  
<211> 19



- <212> ARN
- <213> artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido
- 5 <400> 143  
cagcuucugu uagccacug 19
- <210> 144
- <211> 21
- <212> ARN
- 10 <213> artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido
- <400> 144  
cagcuucugu uagccacuga u 21
- 15 <210> 145
- <211> 21
- <212> ARN
- <213> artificial
- <220>
- 20 <223> oligonucleótido
- <400> 145  
agcuucuguu agccacuguau u 21
- <210> 146
- <211> 22
- 25 <212> ARN
- <213> artificial
- <220>
- <223> oligonucleótido
- <400> 146
- 30 cagcuucugu uagccacuga uu 22
- <210> 147
- <211> 22
- <212> ARN
- <213> artificial
- 35 <220>
- <223> oligonucleótido
- <400> 147

agcuucuguu agccacugau ua 22

<210> 148

<211> 23

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 148

cagcuucugu uagccacuga uua 23

10 <210> 149

<211> 23

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido

<400> 149

agcuucuguu agccacugau uaa 23

<210> 150

<211> 24

20 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 150

25 cagcuucugu uagccacuga uaaa 24

<210> 151

<211> 24

<212> ARN

<213> artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 151

agcuucuguu agccacugau uaaa 24

<210> 152

35 <211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 152  
cagcuucugu uagccacuga uaaaa 25

5 <210> 153  
<211> 24  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>

10 <223> oligonucleótido  
<400> 153  
agcuucuguu agccacugau uaaa 24  
<210> 154  
<211> 20

15 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 154

20 agcuucuguu agccacugau 20  
<210> 155  
<211> 20  
<212> ARN  
<213> artificial

25 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 155  
gcuucuguua gccacugau 20  
<210> 156

30 <211> 21  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

35 <400> 156  
agcuucuguu agccacugau u 21  
<210> 157

<211> 21  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
5 <223> oligonucleótido  
<400> 157  
gcuucuguua gccacugauu a 21  
<210> 158  
<211> 22  
10 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 158  
15 agcuucuguu agccacugau ua 22  
<210> 159  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> artificial  
20 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 159  
gcuucuguua gccacugauu aa 22  
<210> 160  
25 <211> 23  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
30 <400> 160  
agcuucuguu agccacugau uaa 23  
<210> 161  
<211> 23  
<212> ARN  
35 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

<400> 161  
gcuucuguua gccacugauu aaa 23  
<210> 162  
<211> 24  
5 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 162  
10 agcuucuguu agccacugau uaaa 24  
<210> 163  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> artificial  
15 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 163  
gcuucuguua gccacugauu aaa 23  
<210> 164  
20 <211> 23  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
25 <400> 164  
ccaauuguau uuagcauguu ccc 23  
<210> 165  
<211> 20  
<212> ARN  
30 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 165  
agauaccuu uguauuuagc 20  
35 <210> 166  
<211> 19  
<212> ARN

<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 166  
5 gccauuucuc aacagaucu 19  
<210> 167  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> artificial  
10 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 167  
gccauuucuc aacagaucug uca 23  
<210> 168  
15 <211> 23  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
20 <400> 168  
auucucagga auuugugucu uuc 23  
<210> 169  
<211> 21  
<212> ARN  
25 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 169  
ucucaggaau uugugucuuu c 21  
30 <210> 170  
<211> 18  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
35 <223> oligonucleótido  
<400> 170  
guucagcuuc uguuagcc 18

<210> 171  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> artificial  
5 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 171  
cugauuaaaau aucuuuauau c 21  
<210> 172  
10 <211> 18  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
15 <400> 172  
gccgccauuu cucaacag 18  
<210> 173  
<211> 18  
<212> ARN  
20 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 173  
guauuuagca uguucccca 18  
25 <210> 174  
<211> 18  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
30 <223> oligonucleótido  
<400> 174  
caggaauuug ugucuuuc 18  
<210> 175  
<211> 25  
35 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>

<223> oligonucleótido  
 <400> 175  
 gcuuuuuuuu uaguugcugc uuuuu 25  
 <210> 176  
 5 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 10 <400> 176  
 cuuuuuuuu aguugcugcu uuuuu 25  
 <210> 177  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 15 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 177  
 uuuuuuuua guugcugcuc uuuuc 25  
 20 <210> 178  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> oligonucleótido  
 <400> 178  
 uuuuuuuag uugcugcucu uuucc 25  
 <210> 179  
 <211> 25  
 30 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 179  
 35 uuuuuuuagu ugcugcucu uucca 25  
 <210> 180  
 <211> 25



<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
5 <400> 180  
ucuuuuaguu gcugcucuuu uccag 25  
<210> 181  
<211> 25  
<212> ARN  
10 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 181  
cuuuuaguug cugcucuuuu ccagg 25  
15 <210> 182  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
20 <223> oligonucleótido  
<400> 182  
uuuuaguugc ugcucuuuuc caggu 25  
<210> 183  
<211> 25  
25 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 183  
30 uuuaguugcu gcucuuuucc agguu 25  
<210> 184  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
35 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 184

uuaguugcug cucuuuuga gguuc 25

<210> 185

<211> 25

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 185

uaguugcugc uuuuuuccag guuca 25

10 <210> 186

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido

<400> 186

aguugcugcu cuuuuccagg uucaa 25

<210> 187

<211> 25

20 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 187

25 guugcugcuc uuuuccaggu ucaag 25

<210> 188

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 188

uugcugcucu uuuccagguu caagu 25

<210> 189

35 <211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 189  
ugcugcucuu uuccagguuc aagug 25  
5 <210> 190  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
10 <223> oligonucleótido  
<400> 190  
gcugcucuuu uccagguuca agugg 25  
<210> 191  
<211> 25  
15 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 191  
20 cugcucuuuu ccagguuca gugg 25  
<210> 192  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
25 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 192  
ugcucuuuuc cagguucaag ugga 25  
<210> 193  
30 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
35 <400> 193  
gcucuuuucc agguucaagu gggac 25  
<210> 194

<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
5 <223> oligonucleótido  
<400> 194  
cucuuuucca gguucaagug ggaua 25  
<210> 195  
<211> 25  
10 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 195  
15 ucuuuuccag guucaagugg gauac 25  
<210> 196  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
20 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 196  
cuuuuccagg uucaaguggg auacu 25  
<210> 197  
25 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
30 <400> 197  
uuuuccaggu ucaaguggga uacua 25  
<210> 198  
<211> 25  
<212> ARN  
35 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

<400> 198  
 uuuccagguu caagugggau acuag 25  
 <210> 199  
 <211> 25  
 5 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 199  
 10 uuccagguuc aagugggaua cuagc 25  
 <210> 200  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 15 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 200  
 uccagguuca agugggauac uagca 25  
 <210> 201  
 20 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 25 <400> 201  
 ccagguucaa gugggauacu agcaa 25  
 <210> 202  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 30 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 202  
 cagguucaag ugggauacua gcaau 25  
 35 <210> 203  
 <211> 25  
 <212> ARN

<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 203  
5 agguucaagu ggauacuag caaug 25  
<210> 204  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
10 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 204  
gguucaagug ggauacuagc aaugu 25  
<210> 205  
15 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
20 <400> 205  
guucaagugg gauacuagca auguu 25  
<210> 206  
<211> 25  
<212> ARN  
25 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 206  
uucaaguggg auacuagcaa uguua 25  
30 <210> 207  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
35 <223> oligonucleótido  
<400> 207  
ucaaguggga uacuagcau guuau 25

<210> 208  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
5 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 208  
caagugggau acuagcaaug uuauc 25  
<210> 209  
10 <211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
15 <400> 209  
aagugggaua cuagcaaugu uaucu 25  
<210> 210  
<211> 25  
<212> ARN  
20 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 210  
agugggauac uagcaauguu aucug 25  
25 <210> 211  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
30 <223> oligonucleótido  
<400> 211  
gugggacuacu agcaauguua ucugc 25  
<210> 212  
<211> 25  
35 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>

<223> oligonucleótido  
 <400> 212  
 ugggauacua gcaauguuau cugcu 25  
 <210> 213  
 5 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 10 <400> 213  
 gggauacuag caauguuauc ugcuu 25  
 <210> 214  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 15 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 214  
 ggauacuagc aauguuauuc gcuuc 25  
 20 <210> 215  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 25 <223> oligonucleótido  
 <400> 215  
 gauacuagca auguuaucug cuucc 25  
 <210> 216  
 <211> 25  
 30 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 216  
 35 auacuagcaa uguuauucugc uuccu 25  
 <210> 217  
 <211> 25



<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
5 <400> 217  
uacuagcaau guuauugcu uccuc 25  
<210> 218  
<211> 25  
<212> ARN  
10 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 218  
acuagcaaug uuaucuggcuu ccucc 25  
15 <210> 219  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
20 <223> oligonucleótido  
<400> 219  
cuagcaaugu uaucugcuuc cucca 25  
<210> 220  
<211> 25  
25 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 220  
30 uagcaauguu aucugcuucc uccaa 25  
<210> 221  
<211> 25  
<212> ARN  
<213> artificial  
35 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 221

agcaauguua ucugcuuccu ccaac 25

<210> 222

<211> 25

<212> ARN

5 <213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 222

gcaauguuau cugcuuccuc caacc 25

10 <210> 223

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>

15 <223> oligonucleótido

<400> 223

caauguuauc ugcuccucc aacca 25

<210> 224

<211> 25

20 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 224

25 aauguuaucu gcuuccucca accau 25

<210> 225

<211> 25

<212> ARN

<213> artificial

30 <220>

<223> oligonucleótido

<400> 225

auguuaucug cuuccuccaa ccaua 25

<210> 226

35 <211> 25

<212> ARN

<213> artificial

<220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 226  
 uguuaucugc uuccuccaac cauaa 25  
 5 <210> 227  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 10 <223> oligonucleótido  
 <400> 227  
 guuaucugcu uccuccaacc auaaa 25  
 <210> 228  
 <211> 19  
 15 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 228  
 20 gcugccuuu uccaguuc 19  
 <210> 229  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 25 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 <400> 229  
 uuuuuuccag guucaagugg 20  
 <210> 230  
 30 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> oligonucleótido  
 35 <400> 230  
 agguucaagu gggauacua 19  
 <210> 231

<211> 21  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
5 <223> oligonucleótido  
<400> 231  
caauuuuucc cacucaguau u 21  
<210> 232  
<211> 19  
10 <212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 232  
15 uugaaguucc uggagucuu 19  
<210> 233  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> artificial  
20 <220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 233  
uccucaggag gcagcucuaa au 22  
<210> 234  
25 <211> 26  
<212> ARN  
<213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido  
30 <400> 234  
gcgcugguca caaaauccug uugaac 26  
<210> 235  
<211> 27  
<212> ARN  
35 <213> artificial  
<220>  
<223> oligonucleótido

<400> 235

cacuugcuug aaaaggucua caaagga 27

<210> 236

<211> 26

5 <212> ARN

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleótido

<400> 236

10 ggugaauaac uuacaaauu ggaagc 26

**REIVINDICACIONES**

1. Un oligonucleótido antisentido, por el que dicho oligonucleótido antisentido es capaz de unirse a un tramo de al menos 21 nucleótidos dentro de la siguiente secuencia de nucleótidos dentro del exón 45 del pre-ARNm de distrofina:

5'- CCAGGAUGGCAUUGGGCAGCGGCAAACUGUUGUCAGA  
ACAUUGAAUGCAACUGGGGAAGAAUAAUUCAGCAAUC -3' (SEC ID N.º: 2)

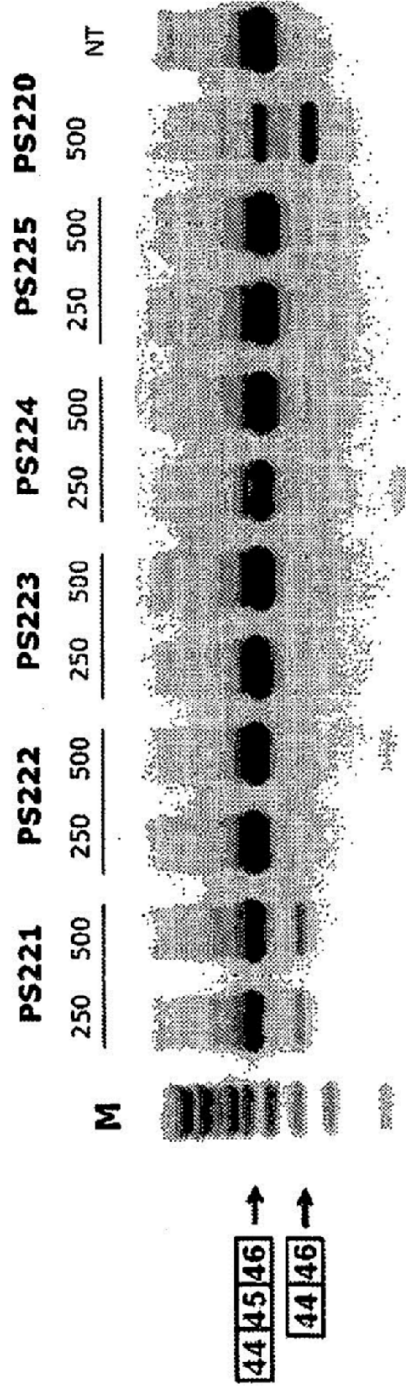
- 5 y en el que dicho oligonucleótido tiene una longitud de al menos 21 nucleótidos y en el que dicho oligonucleótido antisentido no consiste en 5'-AACAGTTTGCCGCTGCCAATGCCA-3', 5'-CTGACAACAGTTTGCCGCTGCCAA-3', 5'-GTTGCATTCAATGTTCTGACAACAG-3', 5'-GCTGAATTATTTCTTCCCCAGTTGC-3' o 5'-ATTATTTCTTCCCCAGTTGCATTCA-3'.
- 10 2. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la longitud de dicho oligonucleótido es de 21 a 50 nucleótidos.
3. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la secuencia de bases de dicho oligonucleótido comprende o consiste en una de las secuencias de bases seleccionadas de:
- 5' AUUCAUGUUCUGACAACAGUUUGC 3' (SEC ID N.º: 4),  
5' CCAGUUGCAUUCAAAUGUUCUGACAA 3' (SEC ID N.º: 5),
- 15 5' CAGUUGCAUUCAAUGUUCUGAC 3' (SEC ID N.º: 6) y  
5' GAUUGCUGAAUUAUUCUCC 3' (SEC ID N.º: 8).
4. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos uno de los nucleótidos es un análogo nucleotídico.
- 20 5. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende uno o más residuos de ARN y/o uno o más residuos de ADN.
6. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el análogo nucleotídico se define como un nucleótido que tiene una base modificada y/o un resto de azúcar modificado y/o un enlace internucleosídico modificado.
- 25 7. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el análogo nucleotídico tiene una base modificada y/o un enlace internucleosídico modificado.
8. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en el que el análogo nucleotídico comprende uno o más restos de azúcares que están mono- o disustituidos en la posición 2', 3' y/o 5'.
9. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende un oligonucleótido antisentido fosforotioato 2'-O sustituido.
- 30 10. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una ribosa 2'-O-metil-fosforotioato.
11. Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende un oligonucleótido antisentido fosforotioato, en el que los restos de azúcares están cada uno 2'-O-metil sustituidos y que comprende una de las secuencias de bases:
- 35 5' AUUCAUGUUCUGACAACAGUUUGC 3' (SEC ID N.º: 4),  
5' CCAGUUGCAUUCAAAUGUUCUGACAA 3' (SEC ID N.º: 5),  
5' CAGUUGCAUUCAAUGUUCUGAC 3' (SEC ID N.º: 6) o  
5' GAUUGCUGAAUUAUUCUCC 3' (SEC ID N.º: 8).
- 40 12. Un oligonucleótido antisentido que es un oligonucleótido antisentido fosforotioato en el que los restos de azúcares están 2'-O-metil sustituidos y que tiene una de las secuencias de bases:
- 5' AUUCAUGUUCUGACAACAGUUUGC 3' (SEC ID N.º: 4),  
5' CCAGUUGCAUUCAAAUGUUCUGACAA 3' (SEC ID N.º: 5),

5' CAGUUGCAUUCAAUGUUCUGAC 3' (SEC ID N.º: 6) o

5' GAUUGCUGAAUUAUUCUCC 3' (SEC ID N.º: 8).

- 5 **13.** Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-9, en el que el enlace internucleosídico modificado está seleccionado del grupo que consiste en un armazón de morfolino, un armazón de carbamato, un armazón de siloxano, un armazón de sulfuro, un armazón de sulfóxido, un armazón de sulfona, un armazón de formacetilo, un armazón de tioformacetilo, un armazón de metilenoformacetilo, un armazón de riboacetilo, un armazón que contiene alcano, un armazón de sulfamato, un armazón de sulfonato, un armazón de sulfonamida, un armazón de metilenoimino, un armazón de metilenoimidazino y un armazón de amida.
- 10 **14.** Un oligonucleótido antisentido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o 13, que comprende un oligómero de morfolino fosforodiamidato (PMO), ácido peptidonucleico (APN) y/o ácido nucleico bloqueado (LNA).
- 15.** Un vector basado en virus, que comprende un casete de expresión que dirige la expresión del oligonucleótido antisentido según se define en la reivindicación 1, 2 o 3.
- 16.** Una composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido antisentido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14 y/o el vector de la reivindicación 15, un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 **17.** Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, que comprende adicionalmente un oligonucleótido antisentido que es capaz de inducir o promover el salto de exón 7, 44, 46, 51, 53, 59 o 67 (como se representa en la tabla 2) en el pre-ARNm de distrofina de un paciente o un vector basado en virus que comprende un casete de expresión que dirige la expresión de dicho antisentido, en el que dicha composición es capaz de excluir al menos los dos exones marcados a partir del pre-ARNm de distrofina, preferentemente dicha composición es capaz de
- 20 excluir la región completa entre dichos dos exones marcados en dicho pre-ARNm.
- 18.** El oligonucleótido antisentido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, el vector de la reivindicación 15, o la composición farmacéutica de la reivindicación 16, para inducir o promover el salto del exón 45 para su uso en el tratamiento de un paciente de DMD o de BMD.
- 25 **19.** La composición farmacéutica de la reivindicación 17 para saltar al menos dos exones marcados a partir del pre-ARNm de distrofina, preferentemente para saltar la región entera entre dichos dos exones marcados en dicho pre-ARNm para su uso en el tratamiento de un paciente de DMD o de BMD.
- 30 **20.** Un procedimiento in vitro para inducir o promover el salto del exón 45 de pre-ARNm de distrofina en una célula aislada de dicho paciente, comprendiendo el procedimiento proveer a dicha célula con un oligonucleótido antisentido según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, con el vector de la reivindicación 15, o con la composición farmacéutica de la reivindicación 16.

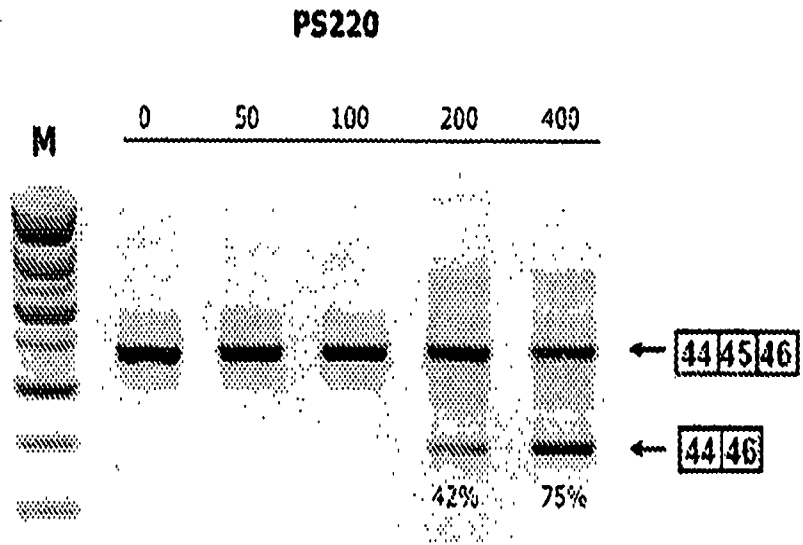
Fig 1



Rastreo de AON PS220-225 específicos del Exón 45 en Miotubos Control Humanos

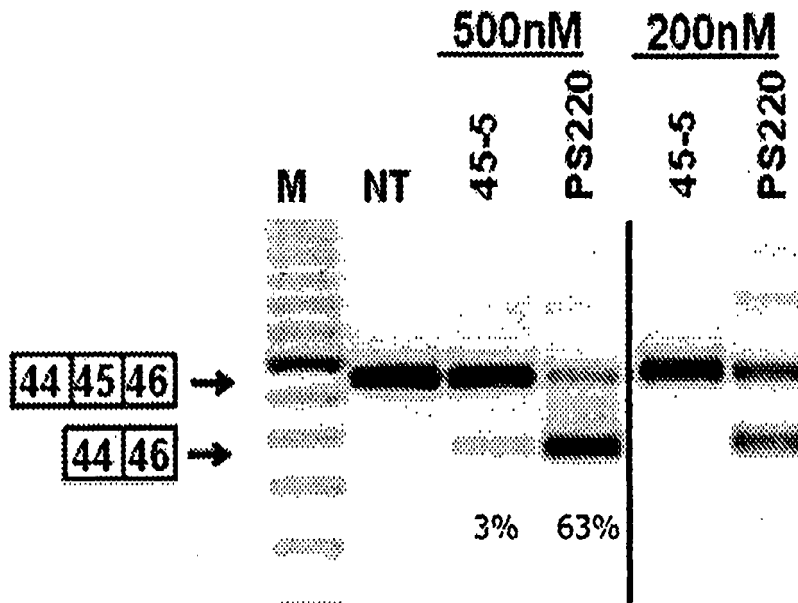


Fig. 2



Rastreo de PS220 específico de Exón 45 a Concentraciones Crecientes en Miotubos Control Humanos

Fig. 3



Comparación del 17-mero AON45-5 frente al 25-mero PS220 en Miotubos Control Humanos