

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 563**

51 Int. Cl.:

A61K 31/56 (2006.01)
A61K 31/57 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C07J 1/00 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2008 E 08842559 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.12.2015 EP 2203173**

54 Título: **Medios y métodos para contrarrestar trastornos del músculo**

30 Prioridad:

26.10.2007 EP 07119351
26.10.2007 US 670 P

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

23.03.2016

73 Titular/es:

ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (50.0%)
Albinusdreef 2
2333 ZA Leiden, NL y
BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V. (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:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 564 563 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

Medios y métodos para contrarresta trastornos del músculo

- 5 [0001] Un trastorno muscular es una enfermedad que normalmente tiene un impacto significativo en la vida de un individuo.
Un trastorno muscular puede tener bien una causa genética o una causa no genética.
Un grupo importante de enfermedades musculares con una causa genética son distrofia muscular de Becker (BMD) y distrofia muscular de Duchenne (DMD).
- 10 Estos trastornos son causados por defectos en un gen de una proteína muscular.
- [0002] Distrofia muscular de Becker y distrofia muscular de Duchenne son distrofias musculares genéticas con una incidencia relativamente alta.
En tanto distrofia muscular de Duchenne como de Becker la proteína muscular distrofina es afectada.
- 15 En Duchenne la distrofina es ausente, mientras que en Becker alguna distrofina está presente pero su producción es muy a menudo insuficiente y/o la distrofina presente está formada anormalmente.
Ambas enfermedades se asocian con herencia recesiva ligada al cromosoma X.
DMD resulta de una mutación de desplazamiento del marco de lectura en el gen DMD.
El desplazamiento del marco de lectura en el gen DMD causa la producción de una proteína de distrofina no funcional truncada, dando como resultado atrofia muscular progresiva y debilidad.
- 20 BMD ocurre como una mutación que no causa un desplazamiento de marco en el gen DMD.
Como en BMD alguna distrofina está presente, a diferencia de en DMD donde la distrofina está ausente, BMD tiene síntomas menos severos que DMD.
La aparición de DMD es anterior a BMD.
- 25 DMD normalmente se manifiesta en la infancia temprana, BMD en los adolescentes o en la edad adulta temprana.
La progresión de BMD es más lenta y menos previsible que DMD.
Pacientes con BMD pueden sobrevivir hasta mediados o final de la edad adulta.
Pacientes con DMD raramente sobreviven más allá de la treintena.
- 30 [0003] Distrofina juega un papel estructural importante en la fibra de músculo, que conecta la matriz extracelular y el citoesqueleto.
La región N-terminal enlaza actina, mientras que el extremo C-terminal es parte del complejo de glicoproteína de distrofina (DGC), que abarca el sarcolema.
En ausencia de distrofina, tensión mecánica lleva a rupturas de sarcolema, causa un flujo descontrolado de calcio en la fibra muscular interior, activando así proteasas activadas por calcio y necrosis de fibra.
- 35 [0004] Para distrofias musculares más genéticas ninguna terapia clínicamente aplicable y eficaz está actualmente disponible.
Técnicas de omisión de exón son hoy en día exploradas para combatir distrofias musculares genéticas.
- 40 Resultados prometedores han sido recientemente proporcionados por nosotros y otros sobre una terapia genética dirigida a restaurar marco de lectura del pre-ARNm de distrofina en células de ratón *mdx* y pacientes de DMD¹⁻¹¹.
Por la omisión dirigida de un exón específico, un fenotipo DMD (carente de distrofina) se convierte en un más suave fenotipo BMD (parcialmente para distrofina en gran medida funcional).
La omisión de un exón es preferiblemente inducida por la unión de oligorribonucleótidos antisentido (AON) dirigidos a uno o ambos de los sitios de empalme, o secuencias internas de exón.
- 45 Ya que un exón solo será incluido en el ARNm cuando los sitios de empalme son reconocidos por el complejo de espliceosoma, sitios de empalme son objetivos obvios para AON.
Alternativamente, o adicionalmente, se usan uno o varios AON que son específicos para al menos parte de una o varias secuencias exónicas.
- 50 Utilizando AON internos de exón específicos para una secuencia de exón 46, fueron previamente capaces de modular el modelo de empalme en miotubos cultivados de dos pacientes DMD diferentes con una supresión¹¹ de exón 45.
Después del tratamiento AON, exón 46 fue omitido, lo que resultó en un marco de lectura restaurado y la inducción de síntesis de distrofina en al menos 75% de las células.
- 55 Hemos recientemente mostrado que omisión de exón puede también ser inducida eficazmente en células de control humano y de músculo de paciente para 39 exones DMD diferentes que usan AON internos de exón^{1, 2, 11-15}.
- [0005] Por lo tanto, técnicas de omisión de exón aplicadas en el gen de distrofina suponen la generación de proteína de distrofina al menos parcialmente funcional, sin bien más corta, en pacientes de DMD.
- 60 Ya que DMD está causada por una proteína de distrofina disfuncional, sería previsto que los síntomas de DMD sean suficientemente aliviados una vez un paciente de DMD ha sido provisto de proteína de distrofina funcional.
Sin embargo, la presente invención proporciona la comprensión de que, aunque técnicas de omisión de exón son capaces de inducir síntesis de distrofina, síntomas DMD es/son todavía más aliviados por administración a un paciente con DMD de un compuesto complementario para reducir inflamación, preferiblemente para reducir inflamación de tejido de músculo, y/o un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.
- 65

Según la presente invención, incluso cuando una deficiencia de proteína distrofina ha sido restaurada en un paciente de DMD, la presencia de inflamación de tejido y células musculares dañadas todavía continúa contribuyendo a los síntomas de DMD.

Por lo tanto, aunque la causa de DMD (es decir una proteína distrofina disfuncional) es aliviada, tratamiento de DMD sigue siendo aún mejorado al utilizar adicionalmente una terapia complementaria según la presente invención.

Además, la presente invención proporciona la comprensión de que una reducción de inflamación no supone reducción significativa de absorción de AON por células musculares.

Esto es sorprendente porque, en general, inflamación mejora el tráfico de células, sangre y otros compuestos.

Como resultado, recepción/entrega de AON es también mejorada durante inflamación.

Por lo tanto, antes de la presente invención sería previsto que una terapia complementaria de contrarrestación de inflamación implicara el riesgo de influir negativamente en terapia AON.

Este, sin embargo, parece no ser el caso.

[0006] La presente divulgación por lo tanto proporciona un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo, donde el método comprende:

- administración a dicho individuo de un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina (al menos parcialmente) funcional, y
- administración a dicho individuo de un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular, y/o un compuesto complementario para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.

[0007] El método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo comprende administración a dicho individuo de un compuesto complementario para reducir inflamación preferiblemente para reducir inflamación de tejido muscular, y/o un compuesto complementario para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.

[0008] La presente invención se refiere a una combinación de:

- un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria a una parte de exón de pre-ARNm de distrofina humana 51 y dicho oligonucleótido se representa por SEC ID NO:204, y
- un compuesto complementario para reducir la inflamación, donde este compuesto comprende un esteroide, dicha combinación siendo para uso como un medicamento, para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en dicho individuo, según la reivindicación 1.

[0009] Se ha descubierto sorprendentemente que la frecuencia de omisión de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o a uno o ambos sitios de empalme de dicho exón, mejora si las células que expresan dicho pre-ARNm están también provistas de un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular, y/o un compuesto complementario para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.

La frecuencia de omisión mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producida en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.

[0010] La presente divulgación proporciona además un método para aumentar omisión de un exón de un pre-ARNm de distrofina en las células que expresan dicho pre-ARNm, donde dicho método comprende

- contactar dicho pre-ARNm en dichas células con un oligonucleótido para la omisión de dicho exón y,
- contactar dichas células con un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular, y/o un compuesto complementario para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.

[0011] Como distrofia muscular de Duchenne y de Becker tienen un fenotipo pronunciado en células musculares, se prefiere que dichas células sean células musculares.

Preferiblemente dichas células comprenden un gen que codifica una proteína distrofina mutante.

Preferiblemente dichas células son las células de un individuo que padece de DMD o BMD.

[0012] La presente invención además proporciona un método para aumentar omisión de un exón de un pre-ARNm de distrofina en las células que expresan dicho pre-ARNm en un individuo que padece de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker, donde el método comprende:

- administración a dicho individuo de un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina (al menos parcialmente) funcional, y
- administración a dicho individuo de un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular, y/o un compuesto complementario para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.

[0013] A un individuo se le proporciona una proteína distrofina funcional de varias maneras.

En una forma de realización una técnica de omisión de exón es aplicada.

Sin embargo, métodos alternativos están disponibles según la divulgación, tales como por ejemplo supresión de codón de terminación por gentamicina o PTC124^{16,17} (también conocido como ácido 3-(5-(2-fluorofenil)-1,2,4-

oxadiazol-3-il)benzoico), y/o entrega de gen adeno-asociado mediado de virus (AAV) de un gen mini o micro-distrofina funcional¹⁸⁻²⁰.

PTC124™ es una marca registrada de PTC Therapeutics, Inc. South Plainfield, Nueva Jersey.

5 [0014] Tal y como se define aquí, una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina de tipo salvaje que corresponde con una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos según se identifica en SEC ID n.º: 1.

Una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina que tiene un dominio de unión de actina en su parte N terminal (primeros 240 aminoácidos en el N terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácidos 3361 hasta 3685) y un dominio terminal C (último aminoácidos 325 en el C terminal) donde cada uno de estos dominios están presentes en una distrofina de tipo salvaje como conocido por la persona experta.

10 Los aminoácidos indicados aquí corresponden a aminoácidos de la distrofina de tipo salvaje siendo representados por SEC ID NO:1.

En otras palabras, una distrofina funcional es una distrofina que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de una distrofina de tipo salvaje. "al menos hasta cierto punto" significa preferiblemente al menos 30%, 40%, 50%, 15 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 100% de una actividad correspondiente de una distrofina funcional de tipo salvaje.

En este contexto, una actividad de una distrofina funcional es preferiblemente enlazarse a actina y al complejo de glicoproteína asociada a la distrofina (DGC)⁵⁶.

20 Unión de distrofina a actina y al complejo DGC se puede visualizar por co-inmunoprecipitación usando extractos de proteína total o análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales, de una biopsia de un músculo sospechoso de ser distrófico, como conocido por la persona experta.

[0015] Individuos que padecen de distrofia muscular de Duchenne típicamente tienen una mutación en el gen que codifica la distrofina que previene síntesis de la proteína completa, es decir de una parada prematura previene la síntesis de la C-terminal

25 En la distrofia muscular de Becker, el gen de distrofina también comprende una mutación en comparación con el tipo salvaje pero la mutación típicamente no incluyen una parada prematura y la C-terminal es típicamente sintetizado.

Como resultado se sintetiza una proteína distrofina funcional que tiene al menos la misma actividad en especie que la proteína de tipo salvaje, aunque no necesariamente la misma cantidad de actividad.

30 El genoma de un individuo BMD codifica típicamente una proteína distrofina que comprende la parte N terminal (primeros 240 aminoácidos en el N terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácidos 3361 hasta 3685) y un dominio C terminal (últimos aminoácidos 325 en el C terminal) pero su dominio con forma de varilla central puede ser más corto que el primero de una distrofina tipo salvaje⁵⁶.

35 Omisión de exón para el tratamiento de DMD es típicamente dirigido a superar una parada prematura en el pre-ARNm por omisión de un exón en el dominio en forma de rodillo de varilla para corregir el marco de lectura y permite la síntesis del resto de la proteína distrofina con la C-terminal, aunque la proteína es un poco más pequeña como resultado de un dominio de varilla menor.

En una forma de realización preferida, a un individuo con DMD y tratado con un método tal y como se define aquí se le proporcionará una distrofina que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de una distrofina de tipo salvaje.

40 Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente de Duchenne o se sospecha que pueda paciente de Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina de un individuo con BMD: típicamente dicha distrofina es capaz de interactuar tanto con actina como con el DGC, pero su dominio con forma de varilla central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus et al (2006, ref 56).

El dominio de varilla central de distrofina de tipo salvaje comprende 24 repetidores tipo espectrina⁵⁶.

45 Por ejemplo, un dominio con forma de varilla central de una distrofina como proporcionada aquí puede comprender de 5 a 23, 10 a 22 o 12 a 18 repetidores tipo espectrina siempre y cuando pueda enlazar con actina y DGC.

[0016] El alivio en uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en un individuo se puede evaluar por cualquiera de los siguientes ensayos: prolongación del tiempo hasta la pérdida del ando, mejora de la fuerza muscular, mejora de la capacidad de levantar peso, mejora del tiempo necesario para levantarse del suelo, mejora en el tiempo que se tarda en andar nueve metros, mejora en el tiempo que se tarda en subir 4 escaleras, 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 es conocido por la persona experta.

55 A modo de ejemplo, la publicación de Manzur et al (2008, ref 58) da una explicación extensa de cada uno de estos ensayos.

Para cada uno de estos ensayos, tan pronto como una mejora o prolongación detectable de un parámetro medido en un ensayo ha sido descubierto, preferiblemente significará que uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker han sido aliviados en un individuo.

60 [0017] Mejora o prolongación detectable es preferiblemente una mejora o prolongación estadísticamente significativa como se describe en Hodgetts et al (2006, ref 57).

Alternativamente, el alivio de uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker se puede evaluar por medición de una mejora de una función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular, como más tarde definido aquí.

65

- [0018] Un compuesto complementario para reducir la inflamación comprende cualquier terapia que sea capaz de al menos reducir la inflamación en parte, preferiblemente inflamación provocada por células de músculo dañadas. Dicho compuesto complementario es más preferiblemente capaz de reducir inflamación de tejido muscular. Inflamación es preferiblemente evaluada por detección de un aumento en el número de células inmunes de infiltración tales como neutrófilos y/o mastocitos y/o células dendríticas y/o linfocitos en el tejido muscular que se sospecha es distrófico.
- 5 Esta evaluación es preferiblemente realizada en secciones transversales de una biopsia⁵⁷ de tejido muscular que se sospecha es distrófico después de tener células inmunes específicamente marcadas según se identifica más arriba. La cuantificación es preferiblemente realizada bajo el microscopio.
- 10 La reducción de inflamación es por lo tanto preferiblemente evaluada por detección de una reducción en el número de células inmunes en una sección transversal de tejido muscular que se sospecha es distrófica. Detectar una reducción preferiblemente significa que el número de al menos un tipo de células inmunes según se identifica arriba es disminuido en al menos 1%, 2%, 3%, 5%, 7%, 10%, 12%, 15%, 17%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con el número de una célula inmune correspondiente en un mismo individuo antes del tratamiento.
- 15 De la forma más preferible, ninguna célula inmune infiltrada se detecta en secciones transversales de dicha biopsia.
- [0019] En la presente divulgación, un compuesto complementario para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular comprende cualquier terapia que sea capaz de hasta cierto grado aumentar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular en comparación con una situación de otro modo similar donde dicho compuesto complementario no está presente.
- 20 La mejora de función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular se puede evaluar utilizando al menos uno de los siguientes ensayos: reducción detectable de creatina-cinasa en sangre, reducción detectable de necrosis de fibras muscular en una sección transversal de biopsia de un músculo sospechoso de ser distrófico, y/o aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de fibras muscular en una sección transversal de biopsia de un músculo sospechoso de ser distrófico.
- 25 Cada uno de estos ensayos es conocido por la persona experta.
- [0020] Creatina-cinasa se puede detectar en sangre como se describe en 57.
- 30 Una reducción detectable en la creatina-cinasa puede significar una reducción de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con la concentración de creatina-cinasa en un mismo individuo antes del tratamiento.
- [0021] Una reducción detectable de necrosis de fibra muscular es preferiblemente evaluada en una biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en 57 usando secciones transversales de biopsia.
- 35 Una reducción detectable de necrosis puede ser una reducción de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del área donde necrosis ha sido identificada usando secciones transversales de biopsia. La reducción se mide por comparación a la necrosis como evaluada en un mismo individuo antes del tratamiento.
- [0022] Un aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de una fibra muscular es preferiblemente evaluada en una sección transversal de biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en 57.
- 40 [0023] Un tratamiento dura alrededor de al menos una semana, alrededor de al menos un mes, alrededor de al menos varios meses, alrededor de al menos un año, alrededor de al menos 2, 3, 4, 5, 6 años o más.
- 45 [0024] En una forma de realización de la divulgación se usa un compuesto complementario para aumentar producción de células musculares dañadas. Un compuesto complementario para aumento de producción de células musculares dañadas comprende cualquier terapia que sea capaz de al menos en parte inducir y/o aumentar la producción de células musculares dañadas.
- 50 Células musculares dañadas son células musculares que tienen significativamente menos funcionalidad que se puede medir clínicamente que un célula muscular saludable intacta. En ausencia de distrofina, tensión mecánica lleva a rupturas de sarcolema, causa un flujo descontrolado de calcio en la fibra muscular interior, activando así proteasas activadas por calcio y necrosis de fibra, dando como resultado células muscular dañadas.
- 55 Aumentar producción de células musculares dañadas significa que células musculares dañadas son más rápidamente descompuestas y/o quitadas en comparación con una situación donde la producción de células musculares dañadas no es aumentada. Producción de células musculares dañadas es preferiblemente evaluada en una biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en 57 usando una sección transversal de una biopsia.
- 60 Un aumento detectable de producción puede ser un aumento de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del área donde producción ha sido identificada utilizando una sección transversal de biopsia. El aumento se mide por comparación a la producción evaluada en un mismo individuo antes del tratamiento.
- [0025] Sin querer ser limitados por la teoría, se cree que aumento de producción de células musculares es preferido porque reduce respuestas inflamatorias.
- 65

- [0026] Según la presente divulgación, una combinación de una terapia para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, junto con una terapia complementaria para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir inflamación de tejido muscular en un individuo, es especialmente adecuada para uso como un medicamento.
 Tal combinación es capaz de aliviar aún mejor uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en comparación con una terapia única para suministrar a un individuo con una proteína distrofina funcional.
 Esta forma de realización también mejora la frecuencia de omisión de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o a uno o ambos sitios de empalme de dicho exón.
 La frecuencia de omisión mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producida en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.
- [0027] Se proporciona además por lo tanto una combinación de un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, y un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular en dicho individuo, para uso como un medicamento.
 Ya que dicha combinación es especialmente adecuada contrarrestando DMD, la presente divulgación también proporciona un uso de un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, y un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular en dicho individuo, para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne.
 Dicha combinación se puede utilizar para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde se forma una proteína distrofina muy corta que no es suficientemente funcional.
- [0028] En la divulgación, compuestos complementarios preferidos para reducir la inflamación incluyen un esteroide, un TNF α inhibidor, una fuente de mIGF-1 y/o un antioxidante.
 Sin embargo, cualquier otro compuesto capaz de reducir inflamación tal y como se define aquí es también incluido en la presente divulgación.
 Cada uno de estos compuestos es extensivamente presentado más adelante.
 Cada uno de los compuestos extensivamente presentados se puede utilizar separadamente o en combinación entre sí y/o en combinación con uno o varios de los compuestos complementarios usados para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.
 Un compuesto complementario de la invención comprende un esteroide.
- [0029] Además esta divulgación estipula que una combinación de una terapia para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, junto con una terapia complementaria para mejorar la función de fibra muscular, integridad y/o supervivencia en un individuo es especialmente adecuada para uso como un medicamento.
 Tal combinación es capaz de aliviar aún mejor uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en comparación con una terapia única para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional.
- [0030] La divulgación por lo tanto además proporciona una combinación de un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, y un compuesto complementario para mejorar función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular en dicho individuo, para uso como un medicamento.
 Esta combinación es también especialmente adecuada contrarrestando DMD.
 Un uso de un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, y un compuesto complementario para mejorar la función de fibra muscular, integridad y/o supervivencia de fibra muscular en dicho individuo para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne es por lo tanto también proporcionado en la divulgación.
 En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde se forma una proteína distrofina muy corta que no es suficientemente funcional.
- [0031] En la divulgación, compuestos complementario preferido para mejorar la función, la integridad y/o supervivencia de fibra muscular incluyen un inhibidor de canal iónico, un inhibidor de proteasa, L-arginina y/o un bloqueador de receptor de angiotensina II tipo I.
 Sin embargo, cualquier otro compuesto capaz de mejorar la función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular tal y como se define aquí es también incluido en la presente divulgación.
 Cada uno de estos compuestos es extensivamente presentado más adelante.
 Cada uno de los compuestos extensivamente presentado se pueden utilizar separadamente o en combinación entre sí y/o en combinación con uno o varios de los compuestos complementarios usados para reducir la inflamación.
- [0032] Puede hacerse un producto farmacéutico que comprende al menos una de las combinaciones anteriormente mencionadas que comprenden un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional junto con un compuesto complementario según la invención.
 Además proporcionado es por lo tanto un producto farmacéutico que comprende:
 - un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, y

- un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular en dicho individuo, y/o un compuesto complementario para mejorar la función de fibra muscular, integridad y/o supervivencia de fibra muscular en dicho individuo, y
 - un portador farmacéuticamente aceptable, adyuvante, diluyente y/o excipiente.

5 Ejemplos de portadores adecuados y adyuvantes se conocen bien en la técnica y por ejemplo comprenden una solución salina.

Rangos de dosis de compuestos usados en un producto farmacéutico son diseñados basándose en estudios de dosis creciente en ensayos clínicos para los que existen requisitos de protocolo rigurosos.

10 [0033] Un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con un esteroide. Como se muestra en los ejemplos, tal combinación produce alivio significativo de síntomas de DMD.

La presente divulgación por lo tanto proporciona un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración a dicho individuo de un esteroide y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

15 Una combinación de un esteroide y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para uso como un medicamento es también proporcionado, al igual que un uso de un esteroide y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

20 Esto también mejora la frecuencia de omisión de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o a uno o ambos sitios de empalme de dicho exón.

La frecuencia de omisión mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producida en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.

25 [0034] Dicha combinación se puede utilizar para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde se forma una proteína distrofina muy corta que no es suficientemente funcional.

[0035] Un esteroide es un lípido terpenoide caracterizado por un esqueleto de carbono con cuatro anillos fusionados, generalmente colocados en una forma 6-6-6-5.

Esteroides varían por los grupos funcionales fijados a estos anillos y el estado de oxidación de los anillos.

30 Esteroides incluyen hormonas y fármacos que se usan normalmente para aliviar hinchazón e inflamación, tal como por ejemplo prednisona, dexametasona y vitamina D.

[0036] Según la presente divulgación efectos adicionales de terapia de esteroide complementaria en pacientes DMD incluyen reducción de inflamación de tejido, supresión de células citotóxicas, y homeostasis de calcio mejorada.

35 Muchos resultados positivos se obtienen en niños más jóvenes.

Preferiblemente el esteroide es un corticoesteroide (glucocorticoesteroide).

Preferiblemente, esteroides de prednisona (tal como prednisona, prednizolone o deflazacort) son usados²¹.

40 [0037] Rangos de dosis de (glucocortico)esteroides a ser usados en los usos terapéuticos como se describe en este caso son diseñados basándose en estudios de dosis creciente en ensayos clínicos para los que existen requisitos de protocolo rigurosos.

Las dosis usuales son aproximadamente 0,5 - 1,0 mg/kg/día, preferiblemente aproximadamente 0,75 mg/kg/día para prednisona y prednizolona, y aproximadamente 0,4 - 1,4 mg/kg/día, preferiblemente aproximadamente 0,9 mg/kg/día para deflazacort.

45 [0038] Un esteroide se puede administrar a dicho individuo antes de la administración de un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional.

Se prefiere que dicho esteroide sea administrado al menos un día, más preferido al menos una semana, más preferido al menos dos semanas, más preferido al menos tres semanas antes de la administración de un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

50 [0039] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con un inhibidor factor alfa de necrosis de tumor (TNF α).

Factor alfa de necrosis de tumor (TNF α) es una citocina proinflamatoria que estimula la respuesta inflamatoria.

55 Bloqueo farmacológico de actividad TNF α con el anticuerpo neutralizante infliximab (Remicade) es clínicamente altamente eficaz en reducir síntomas de enfermedades inflamatorias.

En ratones *mdx*, tanto infliximab como etanercept retrasan y reducen la necrosis de músculo distrófico^{24, 25}, con beneficios fisiológicos adicionales en la fuerza muscular, función de canal de cloruro y niveles de creatina-cinasa reducida que se demuestran en ratón *mdx* adulto ejercitado tratado de manera crónica²⁶.

60 Tales fármacos anti-inflamatorios altamente específicos diseñados para usar en otras condiciones clínicas son alternativas atractivas al uso de esteroides para DMD.

En una forma de realización, el uso de un inhibidor TNF α se limita a periodos de crecimiento muscular intensivo en niños cuando el daño y deterioro muscular son especialmente pronunciados.

[0040] Un aspecto de la presente divulgación proporciona así un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración a dicho individuo de un inhibidor TNF α y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

Una combinación de un inhibidor TNF α y un compuesto para provisión a un individuo de una proteína distrofina funcional para uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso de un inhibidor TNF α y un compuesto para provisión a un individuo de una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde se forma una proteína distrofina muy corta que no es suficientemente funcional.

Un inhibidor TNF α preferido según la divulgación es una proteína de fusión dimérica que consiste en el dominio de Unión de ligandos extracelular del receptor de TNF α humano p75 enlazada a la parte Fc de IgG1 humano.

Un inhibidor TNF α más preferido es ethanercept (Amgen, America)²⁶.

La dosis usual de ethanercept es aproximadamente 0,2 mg/kg, preferiblemente aproximadamente 0,5 mg/kg dos veces una semana.

La administración es preferiblemente subcutánea.

[0041] En otra forma de realización preferida según la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con una fuente de mIGF-1.

Tal y como se define aquí, una fuente de IGF-1 preferiblemente abarca el propio mIGF-1, un compuesto capaz de aumentar la expresión y/o actividad de mIGF-1.

Mejorar es aquí sinónimo de aumentar.

Expresión de mIGF-1 es sinónimo de cantidad de mIGF-1. mIGF-1 promueve regeneración de músculos a través de aumento en la actividad de célula satelital, y reduce inflamación y fibrosis²⁷.

Herida local muscular produce expresión aumentada de mIGF-1.

En ratones transgénicos con extra genes IGF-1, hipertrofia muscular y fibras musculares aumentadas son observadas²⁷.

De forma similar, ratones *mdx* transgénicos muestran degeneración de fibra muscular reducida²⁸.

Regulación del gen mIGF-1 y/o administración de cantidades extra de proteína mIGF-1 o un equivalente funcional de la misma (especialmente la isoforma mIGF-1 Ea [como descrita en 27, isoforma homóloga humana IGF-1 4: SEC ID n.º: 2]) promueven así el efecto de otras, preferiblemente genéticas, terapias para DMD, incluyendo omisión de exón inducido por el antisentido.

Los niveles adicionales de mIGF-1 en los ratones transgénicos anteriormente mencionados no inducen problemas cardíacos ni provocan cáncer, y no tienen efectos secundarios patológicos.

Un aspecto de la presente divulgación proporciona así un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración a dicho individuo de un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional, y provisión a dicho individuo de una fuente de mIGF-1, preferiblemente el mismo mIGF-1, un compuesto capaz de aumentar expresión y/o actividad de mIGF-1.

Como declarado antes, la cantidad de mIGF-1 es por ejemplo aumentada por aumento de expresión del gen mIGF-1 y/o por administración de proteína mIGF-1 y/o un equivalente funcional de la misma (especialmente la isoforma mIGF-1 Ea [como descrita en 27, isoforma homóloga humana IGF-1 4: SEC ID n.º: 2]).

Una combinación de mIGF-1, o un compuesto capaz de aumentar la expresión de mIGF-1 o la actividad de mIGF-1, y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para uso como un medicamento es también proporcionado en esta divulgación, al igual que un uso de mIGF-1, o un compuesto capaz de aumentar expresión de mIGF-1 o actividad mIGF-1, y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

En una forma de realización, tal combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde se forma una proteína distrofina muy corta que no es suficientemente funcional.

[0042] En el contexto de la divulgación, una cantidad o actividad aumentada de mIGF-1 se puede alcanzar mediante el aumento del nivel de expresión génica de un gen IGF-1, mediante el aumento la cantidad de una correspondiente proteína IGF-1 y/o mediante el aumento de una actividad de una proteína IGF1.

Una proteína preferida mIGF-1 ha sido anteriormente definida aquí.

Un aumento de una actividad de dicha proteína se entiende aquí que significa cualquier cambio detectable en una actividad biológica ejercida por dicha proteína o en el nivel estable de dicha proteína en comparación con dicha actividad o estado estable en un individuo que no ha sido tratado.

Cantidad o actividad aumentada de mIGF-1 son preferiblemente evaluadas por detección de expresión aumentada de biomarcador de hipertrofia muscular GATA-2 (como descrita en 27).

[0043] Nivel de expresión génica es preferiblemente evaluado usando técnicas de biología molecular tradicionales tales como análisis de (tiempo real) PCR, series o northern.

Un nivel estable de una proteína se determina directamente por cuantificación de la cantidad de una proteína.

Cuantificar una cantidad de proteína se puede realizar por cualquier técnica conocida tal como electrotransferencia o inmunoensayo que utiliza un anticuerpo dirigido contra una proteína.

La persona experta entenderá que alternativamente o en combinación con la cuantificación de un nivel de expresión génica y/o una proteína correspondiente, la cuantificación de un sustrato de una proteína correspondiente o de

cualquier compuesto conocido por asociarse con una función o actividad de una proteína correspondiente o la cuantificación de dicha función o actividad de una proteína correspondiente que utiliza un ensayo específico se puede utilizar para valorar la alteración de un nivel de actividad o estado estable de una proteína.

5 [0044] En un método de la divulgación, una actividad o nivel de estado estable de dicha proteína se puede alterar en el nivel de la proteína misma, por ejemplo proporcionando una proteína a una célula de una fuente exógena.

[0045] Preferiblemente en la divulgación, un aumento o una regulación del nivel de expresión de un dicho gen significa un aumento de al menos 5% del nivel de expresión de dicho gen usando series.

10 Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de dicho gen significa un aumento de al menos 10%, aún más preferiblemente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 150% o más.

15 En otra forma de realización preferida de la divulgación, un aumento del nivel de expresión de dicha proteína significa un aumento de al menos 5% del nivel de expresión de dicha proteína usando electrotransferencia y/o usando ELISA o un ensayo adecuado.

Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una proteína significa un aumento de al menos 10%, aún más preferiblemente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 150% o más.

20 [0046] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un aumento de actividad de polipéptido significa un aumento de al menos 5% de una actividad de polipéptido que utiliza un ensayo adecuado.

Más preferiblemente, un aumento de actividad de polipéptido significa un aumento de al menos 10%, aún más preferiblemente al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 90%, al menos 150% o más.

25 El aumento es preferiblemente evaluado por comparación con actividad correspondiente en el individuo antes del tratamiento.

[0047] Una forma preferida de proporcionar una fuente de mIGF1 según la divulgación es introducir una codificación de transgen mIGF1, preferiblemente una isoforma mIGF-1 Ea (como descrita en 27, isoforma homóloga humana IGF-1 4: SEC ID n.º: 2), más preferiblemente en un vector AAV como más tarde definido aquí.

30 Tal fuente de mIGF1 es específicamente expresada en el tejido muscular como se describe en ratones en 27.

[0048] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con un antioxidante.

35 Estrés oxidativo es un factor importante en la progresión de DMD y promueve inflamación y fibrosis crónica²⁹.

Los productos más predominantes de estrés oxidativo, los lípidos peroxidados, se aumentan por un promedio de 35% en niños con Duchenne.

Niveles aumentados de la superóxido-dismutasa de enzimas y catalasa reducen la cantidad excesiva de radicales libres que causan estos efectos.

40 De hecho, un complemento dietético *Protandim*® (LifeVantage) fue clínicamente evaluado y se descubrió que aumenta niveles de superóxido-dismutasa (hasta 30%) y catalasa (hasta 54%), que de hecho significativamente inhibieron la peroxidación de lípidos en 29 personas saludables³⁰.

Tal gestión eficaz de estrés oxidativo preserva así la calidad muscular y así promueve el efecto positivo de terapia de DMD.

45 Idebenona es otro antioxidante potente con una estructura química derivada de coenzima natural Q10.

Protege la mitocondria donde trifosfato de adenosina, ATP, se genera por fosforilación oxidante.

La ausencia de distrofina en DMD negativamente afecta a este proceso en el corazón, y probablemente también en el músculo esquelético.

50 Idebenona fue recientemente aplicada en ensayos clínicos en EEUU y Europa que demuestran eficacia en aspectos neurológicos de Ataxia de Friedreich³¹.

Una prueba clínica de fase IIa aleatorizada doble ciego controlada por placebo con Idebenona ha sido iniciada recientemente en la Bélgica, incluyendo 21 niños con Duchenne de 8 a 16 años de edad.

El objetivo primario de este estudio es decidir el efecto de Idebenona en la función del músculo del corazón.

Además diferentes pruebas serán realizadas para detectar el beneficio funcional posible en la fuerza muscular en los

55 pacientes. Cuando es eficaz, Idebenona es un compuesto complementario preferido para usar en un método según la presente divulgación para mejorar el efecto terapéutico de terapia DMD, especialmente en el corazón.

60 Un aspecto de la presente divulgación proporciona así un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración a dicho individuo de un antioxidante y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

Una combinación de un antioxidante y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso de un antioxidante y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

65 En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde una proteína distrofina muy corta se forma que no es suficientemente funcional.

Dependiendo de la identidad del antioxidante, la persona experta conocerá qué cantidades son preferiblemente usadas.

Un antioxidante puede incluir bacósido, silimarina, curcumina, un polifenol, preferiblemente epigallocatequina-3-galato (EGCG).

5 Preferiblemente en la divulgación, un antioxidante es una mezcla de antioxidantes como el complementar dietético *Protandim*[®] (LifeVantage).

Una cápsula diaria de 675mg de *Protandim*[®] comprende 150 mg de *B. monniera* (45% bacósidos), 225mg de *S. marianum* (70-80% silimarina), 150 mg de *W. polvo de somnifera*, 75mg de té verde (98% polifenoles donde 45% EGCG) y 75mg de cúrcuma (95% curcumina).

10 [0049] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con un inhibidor de canal iónico.

La presencia de membranas musculares dañadas en DMD altera el pasaje de iones de calcio en las miofibras, y la homeostasis de calcio consecuentemente interrumpido activa muchas enzimas, por ejemplo proteasas, que causan

15 daño adicional y necrosis muscular. Canales iónicos que contribuyen directamente a la acumulación patológica de calcio en el músculo distrófico son objetivos potenciales para compuestos complementarios para tratar DMD.

Existen pruebas de que algunos fármacos, tales como pentoxifilina, bloquean canales de calcio sensible al ejercicio³² y antibióticos que bloquean canales activados de extensión reducen necrosis de miofibra en ratones *mdx* y niveles

20 de creatina-cinasa en niños con DMD³³. Una forma de realización la divulgación proporciona así un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende la administración a dicho individuo de un inhibidor de canal iónico y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

25 Una combinación de un inhibidor de canal iónico y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para su uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso de un inhibidor de canal iónico y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde una proteína distrofina muy corta se forma que no es suficientemente funcional.

30 [0050] Preferiblemente en la divulgación, inhibidores de canal iónico de la clase de xantinas se usan. Más preferiblemente, dichas xantinas son los derivados de metilxantinas, y de la forma más preferible, dichos

derivados de metilxantina son elegidos del grupo consistente en pentoxifilina, furafilina, isofilina, propentofilina, pentofilina, teofilina, torbafilina, albilina, enprofilina y derivados de las mismas.

35 Muy preferido es el uso de pentoxifilina.

Inhibidores de canal iónico de la clase de xantinas mejoran la frecuencia de omisión de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o a uno o ambos

40 sitios de empalme de dicho exón. La frecuencia de omisión mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producida en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.

[0051] Dependiendo de la identidad del inhibidor de canal iónico, la persona experta conocerá qué cantidades son preferiblemente usadas.

45 Dosificaciones adecuadas de pentoxifilina están entre aproximadamente 1 mg/kg/día y aproximadamente 100 mg/kg/día, dosificaciones preferidas están entre aproximadamente 10 mg/kg/día y 50 mg/kg/día.

Dosificaciones típicas usadas en seres humanos son 20 mg/kg/día.

[0052] En una forma de realización de la divulgación, un inhibidor de canal iónico se administra a dicho individuo antes de la administración de un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional.

50 En esta forma de realización, se prefiere que dicho inhibidor de canal iónico se administre al menos un día, más preferido al menos una semana, más preferido al menos dos semanas, más preferido al menos tres semanas antes de la administración de un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

[0053] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con un inhibidor de proteasa.

Calpaínas son proteasas activadas de calcio que se aumentan en el músculo distrófico y son responsables de la degeneración de miofibra.

Inhibidores de calpaina tales como calpastatina, leupeptina³⁴, calpeptina, inhibidor de calpaina III, o PD150606 son por lo tanto aplicados para reducir el proceso de degeneración.

60 Un compuesto nuevo, BN 82270

(Ipsen) que tiene acción doble tanto como un inhibidor de calpaina como un aumento de la fuerza muscular antioxidante, disminuyó el suero CK y redujo la fibrosis del diafragma *mdx*, indicando un efecto terapéutico con este nuevo compuesto³⁵.

65 Además compuesto de Leupeptina/Carnitina (Myodur) ha sido propuesto recientemente para ensayos clínicos en pacientes con DMD.

[0054] MG132 es además inhibidor proteasómico que ha mostrado reducir daño de membrana muscular, y mejorar las señales histopatológicas de distrofia muscular³⁶.

MG-132 (CBZ-leucil-leucil-leucinal) es un inhibidor permeable a células proteasómico (Ki=4nM), que inhibe Activación de nFkappaB evitando la degradación de IkappaB (IC50 = 3 µM).

5 Además, es un péptido aldehído que inhibe proteólisis mediada por ubiquitina por unión e inactivación de proteasomas 20S y 26S.

MG-132 ha mostrado inhibir la degradación proteasómica de proteínas asociadas a la distrofina en el modelo de ratón *mdx* distrófico³⁶.

10 Este compuesto es así también adecuado para su uso como un compuesto farmacológico complementario para DMD.

Además proporcionado en la divulgación es por lo tanto un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración a dicho individuo de un inhibidor de proteasa y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

15 Una combinación de un inhibidor de proteasa y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para su uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso de un inhibidor de proteasa y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde una proteína distrofina muy corta se forma que no es suficientemente funcional.

20 Dependiendo de la identidad del inhibidor de proteasa, la persona experta conocerá qué cantidades son preferiblemente usadas.

[0055] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con L-arginina.

25 Falta de distrofina se une con la pérdida del complejo DGC en las membranas de fibra, incluyendo sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS).

La expresión de un transgén en ratones *mdx* nNOS redujo en gran medida el daño de la membrana muscular.

De forma similar, administración de L-arginina (el sustrato para sintasa de óxido nítrico) aumentó producción de NO y expresión de utrofina sobreexpresada en ratones *mdx*.

30 seis semanas de tratamiento con L-arginina mejoraron patología muscular y la disminución de CK en suero en ratones *mdx*³⁷.

El uso de L-arginina como una terapia complementaria en combinación con un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional no ha sido descrito.

35 [0056] Además proporcionado en la divulgación es por lo tanto un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración L-arginina a dicho individuo y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

Una combinación de L-arginina y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para su uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso de L-arginina y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

40 En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde una proteína distrofina muy corta se forma que no es suficientemente funcional.

45 [0057] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con bloqueador de receptor Losartana de angiotensina II tipo 1 que normaliza arquitectura muscular, reparación y función, como se muestra en el modelo de ratón *mdx* deficiente en distrofina²³.

50 Un aspecto de la presente divulgación proporciona así un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración a dicho individuo del bloqueador de receptor Losartana de angiotensina II tipo 1, y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

Una combinación de bloqueador de receptor Losartana de angiotensina II tipo 1 y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para su uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso para bloqueador de receptor Losartana de angiotensina II tipo 1 y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

55 En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde una proteína distrofina muy corta se forma que no es suficientemente funcional.

60 Dependiendo del bloqueador de receptor Losartana de angiotensina II tipo 1, la persona experta conocerá qué cantidades son preferiblemente usadas.

[0058] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con un inhibidor de enzima de conversión de angiotensina (ECA), preferiblemente perindopril.

65 Inhibidores de la ACE son capaces de reducir la presión sanguínea.

Iniciación temprana de tratamiento con perindopril se asocia a una mortalidad inferior en pacientes con DMD ²².

Un aspecto de la presente divulgación proporciona así un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, el método comprendiendo administración a dicho individuo de un inhibidor ECA, preferiblemente perindopril, y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

Una combinación de un inhibidor ECA, preferiblemente perindopril, y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para su uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso de un inhibidor ECA, preferiblemente perindopril, y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde una proteína distrofina muy corta se forma que no es suficientemente funcional.

Las dosis usuales de un inhibidor ECA, preferiblemente perindopril son aproximadamente de 2 a 4 mg/día ²².

[0059] En una forma de realización más preferida de la divulgación, un inhibidor ECA se combina con al menos uno de los compuestos complementario previamente identificados.

[0060] En otra forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se combina con un compuesto que es capaz de aumentar la omisión de exón y/o inhibir ensamblaje de espliceosoma y/o empalme.

Compuestos químicos pequeños, tales como por ejemplo derivados de indol específico, han mostrados que selectivamente cohiben ensamblaje y empalme de espliceosoma³⁸, por ejemplo por interferencia con la unión de proteínas ricas en en arginina o serina (SR) para su potenciadores de empalme afines (ISE o ESE) y/o por interferencia con la unión de represores de empalme para secuencias de silenciador (ESS o ISS).

Estos compuestos son por lo tanto adecuados para aplicar como compuestos complementarios que mejoran omisión de exón.

[0061] Además proporcionado por la divulgación es por lo tanto un método para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en un individuo, donde el método comprende administración a dicho individuo de un compuesto para aumento de omisión de exón y/o inhibición de ensamblaje de espliceosoma y/o empalme, y un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

Una combinación de un compuesto para aumento de omisión de exón y/o inhibición de ensamblaje de espliceosoma y/o empalme y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional para su uso como un medicamento es también proporcionado en la divulgación, al igual que un uso de un compuesto para aumento de omisión de exón y/o inhibición de ensamblaje de espliceosoma y/o empalme y un compuesto para suministrar a un individuo una proteína de distrofina funcional para la preparación de un medicamento para aliviar uno o varios síntomas de DMD.

En una forma de realización de la divulgación, dicha combinación se usa para aliviar uno o varios síntomas de una forma severa de BMD donde una proteína distrofina muy corta se forma que no es suficientemente funcional.

Dependiendo de la identidad del compuesto que es capaz de aumentar omisión de exón y/o inhibir ensamblaje de espliceosoma y/o empalme, la persona experta conocerá qué cantidades son preferiblemente usadas.

En una forma de realización más preferida de la divulgación, un compuesto para aumento de omisión de exón y/o inhibición de ensamblaje de espliceosoma y/o empalme se combina con un inhibidor ECA y/o con cualquier compuesto complementario como identificados aquí antes.

[0062] Un producto farmacéutico que comprende un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional, cualquiera de los compuestos complementario anteriormente mencionado, y un portador, relleno, conservante, adyuvante, solubilizador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable es también proporcionado.

Tal portador, relleno, conservante, adyuvante, solubilizador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable puede por ejemplo encontrarse en el Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

[0063] Por lo tanto, aquí descrito es un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la invención, donde dicho compuesto complementario comprende un esteroide, un inhibidor ECA (preferiblemente perindopril), bloqueador de receptor Losartana de angiotensina II tipo 1, un inhibidor (TNF α) de necrosis de tumor de factor-alfa, una fuente de mIGF-1, preferiblemente mIGF-1, un compuesto para aumento de expresión mIGF-1, un compuesto para aumento actividad mIGF-1, un antioxidante, un inhibidor de canal iónico, un inhibidor de proteasa, L-arginina y/o un compuesto para aumento de omisión de exón y/o inhibición de ensamblaje de espliceosoma y/o empalme.

Como se describe antes en la divulgación, un individuo dispone de una proteína distrofina funcional en varias maneras, por ejemplo por supresión de codón de terminación por gentamicina o PTC124^{16,17}, o por entrega de gen mediado por virus adeno-asociado (AAV) de un gen funcional de mini o micro-distrofina¹⁸⁻²⁰.

- [0064] Preferiblemente, sin embargo, dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, para al menos en parte disminuir la producción de una proteína de distrofina aberrante en dicho individuo.
- Disminuir la producción de una distrofina aberrante ARNm, o proteína distrofina aberrante, preferiblemente significa que 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o menos de la cantidad inicial de distrofina aberrante ARNm, o proteína de distrofina aberrante, sigue siendo detectable por RT PCR (ARNm) o inmunofluorescencia o electrotransferencia (proteína).
- Una distrofina aberrante ARNm o proteína es también denominada en este caso como una ARNm o proteína distrofina no funcional.
- Una proteína distrofina no funcional es preferiblemente una proteína de distrofina que no es capaz de enlazar actina y/o miembros del complejo de proteína DGC.
- Una proteína distrofina no funcional o distrofina ARNm típicamente no tiene o no codifica una proteína de distrofina con una C-terminal intacta de la proteína.
- Dicho oligonucleótido preferiblemente comprende un antisentido oligorribonucleótido.
- En una forma de realización preferida una técnica de omisión de exón es aplicada.
- Omisión de exón interfiere con los procesos de empalme natural que ocurren dentro de una célula eucariota.
- En eucariotas más altas la información genética para proteínas en el ADN de la célula se codifica en exones que son separados entre sí por secuencias intrónicas.
- Estos intrones son en algunos muy largos.
- La maquinaria de transcripción de eucariotas genera un pre-ARNm que contiene tanto exones como intrones, mientras que la maquinaria de empalme, a menudo ya durante la producción del pre-ARNm, genera la región de codificación real de la proteína cortando y empalmado juntos los exones presentes en el pre-mRNA.
- [0065] Omisión de exón produce ARNm maduro que carece de al menos un exón omitido.
- Así, cuando dicho exón codifica para aminoácidos, omisión de exón lleva a la expresión de un producto alterado.
- Tecnología para omisión de exón es actualmente dirigida hacia el uso de oligonucleótidos antisentido (AON).
- Mucho de este trabajo es hecho en el modelo de ratón *mdx* para distrofia muscular de Duchenne.
- El ratón *mdx*, que lleva una mutación sin sentido en el exón 23 del gen de distrofina, ha sido usado como un modelo animal de DMD.
- A pesar de la mutación *mdx*, que debería excluir la síntesis de una proteína distrofina funcional, fibras positivas de distrofina raras de origen natural han sido observadas en el tejido muscular *mdx*.
- Se piensa que estas fibras positivas de distrofina han surgido de un mecanismo de omisión de exón aparentemente de origen natural, bien debido a mutaciones somáticas o a través de empalme alternativo.
- AON dirigidos hacia, respectivamente, el 3' y/o 5' sitios de empalme de intrones 22 y 23 en el pre-ARNm de distrofina, han mostrados interferir con factores normalmente implicados en la eliminación de intrón 23 de modo que también exón 23 fue quitado del mRNA^{3, 5, 6, 39, 40}.
- [0066] Por la omisión dirigida de un exón específico, un fenotipo DMD se convierte en un más suave fenotipo BMD.
- La omisión de un exón es preferiblemente inducido por la unión de AON dirigidos a unos o ambos de los sitios de empalme, o secuencias internas de exón.
- Un oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna de exón típicamente exhibe ninguna superposición con secuencias sin exón.
- Preferiblemente no se superpone con los sitios de empalme al menos no en la medida en que estos están presentes en el intrón.
- Un oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna de exón preferiblemente no contiene una secuencia complementario para un intrón adyacente.
- Además proporcionado es así un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la invención, donde dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, para inclusión de inhibición de un exón de un pre-ARNm de distrofina en el ARNm producido del empalme de dicho pre-ARNm.
- Una técnica de omisión de exón es preferiblemente aplicada de manera que la ausencia de un exón de ARNm producida de pre-ARNm de distrofina genera una región de codificación para una proteína distrofina funcional, sin embargo más corta.
- En este contexto, inhibir inclusión de un exón preferiblemente significa que la detección de la distrofina original aberrante ARNm es disminuida en al menos aproximadamente 10% como evaluado por RT-PCR o que una proteína distrofina aberrante correspondiente es disminuida en al menos aproximadamente 10% como evaluado por Inmunofluorescencia o análisis de electrotransferencia.
- La reducción es preferiblemente de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.
- [0067] Una vez se prevé un paciente de DMD con una proteína distrofina funcional, la causa de DMD es apartada.
- Por lo tanto, luego sería previsto que los síntomas de DMD sean suficientemente aliviados.
- Sin embargo, como ya se ha descrito antes, la presente invención proporciona la comprensión de que, aunque técnicas de omisión de exón son capaces de proporcionar una proteína distrofina funcional, un síntoma de DMD sigue siendo además aliviado por administración a un paciente con DMD de un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para inflamación de tejido muscular de reducción, y/o un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.

Además, la presente invención proporciona la comprensión de que una terapia complementaria que contrarresta la inflamación no afecta negativamente a la terapia de AON.

La presente invención además proporciona la comprensión de que la frecuencia de omisión de un exón de distrofina de un pre-ARNm que comprende dicho exón es mejorado, cuando se usa un oligonucleótido dirigido hacia el exón o a uno o ambos sitios de empalme de dicho exón.

La frecuencia de omisión mejorada también aumenta el nivel de proteína distrofina funcional producido en una célula muscular de un individuo con DMD o BMD.

[0068] Ya que un exón de un pre-ARNm de distrofina solo será incluido en el ARNm resultante cuando los sitios de empalme son reconocidos por el complejo de espliceosoma, sitios de empalme son objetivos obvios para AON.

Una forma de realización de la presente divulgación por lo tanto proporciona un método, combinación, uso o producto farmacéutico, donde dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a una región sin exón de una distrofina pre ARNm.

En una forma de realización de la divulgación, se usa un AON que es únicamente complementario a una región sin exón de una distrofina pre ARNm.

Esto sin embargo no es necesario: es también posible usar un AON que comprende una secuencia específica de intrón así como secuencia específica de exón.

Tal AON comprende una secuencia que es complementaria a una región sin exón de una distrofina pre ARNm, al igual que una secuencia que es complementaria a una región de exón de una distrofina pre ARNm.

Por supuesto, un AON no es necesariamente complementario a la secuencia entera de un exón o intrón de distrofina.

AON que son complementarios a una parte de tal exón o intrón son preferidos.

Un AON es preferiblemente complementario a por lo menos parte de un exón de distrofina y/o intrón, donde dicha parte tiene al menos 13 nucleótidos.

[0069] Empalme de un pre-ARNm de distrofina ocurre vía dos reacciones de transesterificación secuencial.

Primero, el 2'OH de un nucleótido de punto de derivación específico en el intrón que se define durante ensamblaje de espliceosoma ejecuta un ataque nucleofílico en el primer nucleótido del intrón en el 5' sitio de empalme que forma el lazo intermedio.

Segundo, el 3'OH del liberado 5' exón luego ejecuta un ataque nucleofílico en el nucleótido último del intrón en el 3' sitio de empalme juntando así los exones y liberando el lazo de intrón.

El punto de derivación y sitios de empalme de un intrón son así implicados en un evento de empalme.

Por lo tanto, un oligonucleótido que comprende una secuencia que es complementaria hasta tal punto de derivación y/o sitio de empalme es preferiblemente usado para omisión de exón.

Además proporcionado es por lo tanto un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la divulgación, donde dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a un sitio de empalme y/o punto de derivación de una distrofina pre ARNm.

[0070] Ya que sitios de empalme contienen secuencias de consenso, el uso de un oligonucleótido o un equivalente funcional del mismo (aquí también llamado un AON) que comprende una secuencia que es complementaria a un sitio de empalme implica el riesgo de hibridación promiscua.

Hibridación de AON para otros sitios de empalme diferentes a los sitios del exón a ser omitido podrían fácilmente interferir con la exactitud del proceso de empalme.

Para superar estos y otros problemas potenciales relacionados con el uso de AON que son complementarios a una secuencia de intrón, una forma de realización preferida de la divulgación proporciona un método, combinación, uso o producto farmacéutico, donde dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a un exón de pre-ARNm de distrofina.

Preferiblemente, dicho AON es capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de al menos un exón en dicho pre-ARNm de distrofina.

Interferir con una señal de inclusión de exón (EIS) tiene la ventaja de que tales elementos se sitúan en el exón.

Proporcionando un AON para que el interior del exón sea omitido, es posible interferir con la señal de inclusión de exón y así eficazmente enmascarar el exón del equipo de empalme.

El fallo del equipo de empalme de reconocer el exón a ser omitido así lleva a exclusión del exón del ARNm final.

Esta forma de realización no interfiere directamente con el proceso enzimático de la maquinaria de empalme (la unión de los exones).

Se piensa que esto permite que el método sea más específico y/o fiable.

Se piensa que un EIS es una estructura particular de un exón que permite a receptor y donador de empalme asumir una conformación espacial particular.

En este concepto es la conformación espacial particular lo que habilita la a maquinaria de empalme reconocer el exón.

Sin embargo, la divulgación ciertamente no está limitada a este modelo.

Se ha descubierto que agentes capaces de unión a un exón son capaces de inhibición de un EIS.

Un AON puede específicamente contactar dicho exón en cualquier punto y todavía ser capaz de específicamente inhibir dicho EIS.

[0071] Utilizando AON internos de exón específico para una secuencia de exón 46, fuimos previamente capaces de modular el modelo de empalme en miotubos cultivados de dos pacientes con DMD diferentes con una supresión de exón 45¹¹.

Después del tratamiento AON, exón 46 fue omitido, lo que resultó en un marco de lectura restaurado y la inducción de síntesis de distrofina en al menos 75% de las células.

Hemos recientemente mostrado que omisión de exón puede también ser inducida eficazmente en el control humano y series de pacientes con mutaciones diferentes, incluyendo supresiones, duplicaciones y mutaciones puntuales, para 39 exones DMD diferentes usando AON interno de exón^{1, 2 11-15}.

[0072] Un equivalente funcional de un oligonucleótido preferiblemente significa un oligonucleótido tal y como se define aquí donde uno o varios nucleótidos han sido sustituidos y donde una actividad de dicho equivalente funcional se retiene por lo menos hasta cierto punto.

Preferiblemente, una actividad de dicho equivalente funcional es proporcionar una proteína distrofina funcional.

Dicha actividad de dicho equivalente funcional es por lo tanto preferiblemente evaluada por cuantificación de la cantidad de una proteína distrofina funcional.

Una distrofina funcional es aquí preferiblemente definida como una distrofina capaz de enlazar actina y miembros del complejo de proteína DGC.

La evaluación de dicha actividad de un oligonucleótido es preferiblemente hecha por RT-PCR o por Inmunofluorescencia o análisis de electrotransferencia.

Dicha actividad es preferiblemente retenida por lo menos hasta cierto punto cuando representa al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70% o al menos 80% o al menos 90% o al menos 95% o más de actividad correspondiente de dicho oligonucleótido del cual el equivalente funcional deriva.

En todo esta aplicación, cuando la palabra oligonucleótido se usa se puede sustituir por un equivalente funcional del mismo tal y como se define aquí.

[0073] Por lo tanto, el uso de un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende o consistente en una secuencia que es complementaria a un exón de pre-ARNm de distrofina proporciona buenos resultados anti-DMD.

Se usa un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende o consiste en una secuencia que es complementaria a por lo menos parte de exón de pre-ARNm de distrofina 2, 8, 9, 17, 19, 29, 40-46, 48-53, 55 o 59, donde dicha parte tiene al menos 13 nucleótidos.

Sin embargo, dicha parte también puede tener al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos.

[0074] De la forma más preferible en la divulgación se usa un AON que comprende o consiste en una secuencia que es complementaria a por lo menos parte de exón de pre-ARNm de distrofina 51, 44, 45, 53, 46, 43, 2, 8, 50 y/o 52, donde dicha parte tiene al menos 13 nucleótidos.

Sin embargo, dicha parte también puede tener al menos 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos.

Muchos oligonucleótidos preferidos de la divulgación se identifican por cada uno de las siguientes secuencias SEC ID NO: 3 a SEC ID n.º: 284.

Por consiguiente, un oligonucleótido más preferido como usado en la divulgación se representa por una secuencia de SEC ID NO:3 a SEC ID NO:284.

Un oligonucleótido más preferido como usados en la divulgación es seleccionado del grupo consistente en SEC ID NO:3 a NO:284.

El oligonucleótido antisentido de la invención comprende una secuencia que es complementaria a una parte de pre-ARNm de distrofina de exón humano 51 y dicho oligonucleótido se representa por SEC ID NO:204.

[0075] Dichos exones se enumeran en el orden decreciente de aplicabilidad de población de pacientes.

Por lo tanto, el uso de un AON que comprende una secuencia que es complementaria a por lo menos parte de distrofina pre-exón de ARNm 51 es adecuado para uso en una parte más grande de la población de pacientes con DMD en comparación con un AON que comprende una secuencia que es complementaria a exón de pre-ARNm de distrofina 44, etcétera.

[0076] En una forma de realización preferida, un oligonucleótido de la divulgación que comprende una secuencia que es complementaria a parte de distrofina pre-ARNm es tal que la parte complementaria es al menos 50% de la longitud del oligonucleótido de la invención, más preferiblemente al menos 60%, aún más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90% o aún más preferiblemente al menos 95%, o aún más preferiblemente 98% o más.

En una forma de realización más preferida de la divulgación, el oligonucleótido consiste en una secuencia que es complementaria a parte de distrofina pre-ARNm tal y como se define aquí.

Por ejemplo, un oligonucleótido puede comprender una secuencia que es complementaria a parte de distrofina pre-ARNm tal y como se define aquí y secuencias flanqueantes adicionales.

En una forma de realización más preferida de la divulgación, la longitud de dicha parte complementaria de dicho oligonucleótido es de al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos. Preferiblemente en la divulgación, secuencias flanqueantes adicionales se utilizan para modificar la unión de una proteína al oligonucleótido, o para modificar una propiedad termodinámica del oligonucleótido, más preferiblemente para modificar afinidad de unión de ARN objetivo.

[0077] Una forma de realización preferida de la divulgación proporciona un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la invención, donde dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende:

- una secuencia que es complementaria a una región de un exón de pre-ARNm de distrofina que se hibridiza a otra parte de un exón de pre-ARNm de distrofina (estructura cerrada), y
- una secuencia que es complementaria a una región de un exón de pre-ARNm de distrofina que no se hibridiza en dicho pre-ARNm de distrofina (estructura abierta).

[0078] Para esta forma de realización, se hace referencia a nuestra solicitud de patente WO 2004/083432. Moléculas ARN muestran estructuras secundarias fuertes, en su mayoría debido a emparejamiento de base de extensiones complementarias o parcialmente complementarias en el mismo ARN.

Se ha pensado desde hace mucho tiempo que estructuras en el ARN juegan un papel en la función del ARN.

Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que la estructura secundaria del ARN de un exón juega un papel en la estructuración de del proceso de empalme.

A través de su estructura, un exón es reconocido como una parte que necesita de incluida en el ARNm.

Aquí esta función de señalización es referida como una señal de inclusión de exón.

Un oligonucleótido complementario de esta forma de realización es capaz de interferir con la estructura del exón y es así capaz de interferir con la señal de inclusión de exón del exón.

Se ha descubierto que muchos oligonucleótidos complementarios de hecho comprenden esta capacidad, algunos más eficaces que otros.

Oligonucleótidos de esta forma de realización preferida, es decir aquellos con dicha superposición dirigidos hacia estructuras abiertas y cerradas en el exón nativo ARN, son una selección de todos los oligonucleótidos posibles.

La selección abarca oligonucleótidos que pueden interferir eficazmente con una señal de inclusión de exón.

Sin pretender imponer ninguna teoría se piensa que la superposición con una estructura abierta mejora la eficiencia de invasión del oligonucleótido (es decir aumenta la eficiencia con la cual el oligonucleótido puede introducir la estructura), mientras que el recubrimiento con la estructura cerrada aumenta posteriormente la eficiencia de interferencia con la estructura secundaria del ARN del exón, y así interfieren con la señal de inclusión de exón.

Se ha descubierto que la longitud de la complementariedad parcial para la estructura abierta y cerrada no es extremadamente restringida.

Tenemos rendimientos altos observados con oligonucleótidos con longitudes variables de complementariedad en cualquiera de estas estructura.

El término complementariedad se utiliza en este caso para referirse a una extensión de ácidos nucleicos que pueden hibridar otra extensión de ácidos nucleicos bajo condiciones fisiológicas.

Es así no absolutamente requerido que todas las bases en la región de complementariedad sean capaces de emparejar con bases en la cadena opuesta.

Por ejemplo, al diseñar del oligonucleótido uno puede querer incorporar por ejemplo un residuo que no empareja base con la base en la cadena complementaria.

Incompatibilidades pueden hasta cierto punto ser permitidas, si dadas las circunstancias en la célula, la extensión de nucleótidos es capaz de hibridación a la parte complementaria.

En una forma de realización preferida de la divulgación una parte complementaria (bien a dicha estructura abierto o a dicha estructura cerrada) comprende al menos 3, y más preferiblemente al menos 4, nucleótidos consecutivos.

Las regiones complementarias son preferiblemente diseñadas de manera que, cuando combinadas, son específicas para el exón en el pre-ARNm.

Tal especificidad se puede crear con varias longitudes de regiones complementarias ya que esta depende de las secuencias reales en otros (pre) ARNm en el sistema.

El riesgo de que también uno o varios otros pre-ARNm será capaz de hibridar al oligonucleótido disminuye al aumentar el tamaño del oligonucleótido.

Es claro que oligonucleótidos que comprenden incompatibilidades en la región de complementariedad pero que retienen la capacidad de hibridar a la región objetivo en el pre-ARNm, pueden ser usados.

Sin embargo, preferiblemente al menos las partes complementarias no comprenden tales incompatibilidades ya que estas típicamente tienen una eficiencia más alta y una especificidad más alta, que oligonucleótidos con tales incompatibilidades en unas regiones complementarias.

Se piensa que fuerzas de hibridación más altas, (es decir, aumentando número de interacciones con la cadena opuesta) son favorables para aumentar la eficiencia del proceso de interferencia con la maquinaria de empalme del sistema.

Preferiblemente, la complementariedad es entre 90 y 100%.

En general esto permite aproximadamente 1 o 2 incompatibilidades¹⁶ en un oligonucleótido de alrededor de 20 nucleótidos.

[0079] La estructura secundaria es mejor analizada en el contexto del pre-ARNm donde el exón reside.

Tal estructura se puede analizar en el ARN real.

Sin embargo, es actualmente posible predecir bastante bien la estructura secundaria de una molécula de ARN (con costes de energía mínimos), usando programas de modelado de estructura.

Un ejemplo no limitativo de un programa adecuado es ARN mfold versión 3.1 server⁴¹.

5 Un experto en la técnica será capaz de predecir, con reproducibilidad adecuada, una estructura posible del exón, dada la secuencia de nucleótidos.

Mejores predicciones se obtienen cuando se proporciona tal programa de modelación con tanto el exón como secuencias de intrones flanqueantes.

Es típicamente no necesario modelar la estructura del pre-ARNm entero.

10 [0080] Las estructuras abierta y cerrada a las que el oligonucleótido es dirigido, son preferiblemente adyacentes una a la otra.

Se piensa que de esta manera el recocimiento del oligonucleótido a la estructura abierta induce apertura de la estructura cerrada a partir de lo cual el recocimiento progresa a esta estructura cerrada.

15 A través de esta acción la estructura previamente cerrada asume una conformación diferente.

La conformación diferente produce la interrupción de la señal de inclusión de exón.

Sin embargo, cuando secuencias aceptoras (críptico) de empalme y/o donantes potenciales están presentes en el exón dirigido, ocasionalmente una señal de inclusión de exón nueva es generada definiendo un (neo) exón diferente, es decir con un diferente 5' extremo, un diferente 3' extremo, o ambos.

20 Este tipo de actividad está dentro del campo de la presente divulgación ya que el exón dirigido es excluido del ARNm.

La presencia de un exón nuevo, que contiene parte del exón dirigido, en el ARNm no altera el hecho de que el exón dirigido, como tal, es excluido.

La inclusión de un neoexón puede verse como un efecto secundario que ocurre solo ocasionalmente.

25 Hay dos posibilidades cuando la omisión de exón se utiliza para devolver (parte de) un marco de lectura abierto de distrofina que es interrumpido como resultado de una mutación.

Una es que el neoexón es funcional en la restauración del marco de lectura, mientras que en el otro caso el marco de lectura no es restaurado.

30 Al seleccionar los oligonucleótidos para restaurar los marcos de lectura de distrofina mediante omisión de exón es por supuesto claro que bajo estas condiciones solo se seleccionan aquellos oligonucleótidos que de hecho resultan en omisión de exón que restaura el marco de lectura abierto de distrofina, con o sin un neoexón.

[0081] Además proporcionado es un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la divulgación, donde dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que comprende una secuencia que es complementaria a un sitio de unión para una proteína arginina de serina (SR) en el ARN de un exón de un pre-ARNm de distrofina.

35 En nuestra solicitud de patente WO 2006/112705 hemos descrito la presencia de una correlación entre la efectividad de un oligonucleótido antisentido interno de exón (AON) en la omisión de exón de inducción y la presencia de un sitio de unión SR predicho (por ejemplo por ESEfinder) en el sitio de pre-ARNm objetivo de dicho AON.

40 Por lo tanto, en una forma de realización de la divulgación un oligonucleótido es generado comprendiendo determinación de un sitio de unión (putativa) para una proteína SR (Ser-Arg) en el ARN de un exón de distrofina y produciendo un oligonucleótido que es complementario a dicho ARN y que al menos parcialmente se superpone a dicho sitio de unión (putativo).

45 El término "al menos parcialmente se superpone" es definido aquí para comprender una superposición de solo un único nucleótido de un sitio de unión SR al igual que nucleótidos múltiples de dicho sitio de unión al igual que una superposición completa de dicho sitio de unión.

Esta forma de realización preferiblemente comprende además determinación de una estructura secundaria de dicho ARN, una región que se hibrida a otra parte de dicho ARN (estructura cerrada) y una región que es no hibridada en dicha estructura (estructura abierta), y posteriormente genera un oligonucleótido que al menos parcialmente superpone dicho (putativo) sitio de unión y que superpone al menos parte de dicha estructura cerrada y superpone al menos parte de dicha estructura abierta.

50 De esta manera aumentamos la oportunidad de obtención de un oligonucleótido que es capaz de interferir con la inclusión de exón del pre-ARNm en el ARNm.

Es posible que una primera región de unión SR seleccionado no tiene la estructura cerrada-abierta solicitada en cuyo caso además (segundo) sitio de unión a proteínas SR se selecciona que es luego posteriormente evaluado para la presencia de una estructura cerrada-abierta.

55 Este proceso es continuo hasta que una secuencia se identifica que contiene un sitio de unión a proteínas SR al igual que una (parcialmente superpuesta) estructura cerrada-abierta.

Esta secuencia es luego usada para diseñar un oligonucleótido que es complementario a dicha secuencia.

60 [0082] Tal método para generar un oligonucleótido es también realizado por inversión del orden descrito, es decir primero generando un oligonucleótido que comprende determinación, de una estructura secundaria de ARN de un exón de distrofina, una región que asume una estructura que se hibrida para otra parte de dicho ARN (estructura cerrada) y una región que es no hibridada en dicha estructura (estructura abierta), y posteriormente generando un oligonucleótido, del cual al menos una parte de dicho oligonucleótido es complementaria a dicha estructura cerrada y del cual al menos otra parte de dicho oligonucleótido es complementaria a dicha estructura abierta.

65

Este es luego seguido de determinación si un sitio de unión a SR proteínas al menos superpone con dicha estructura abierta/cerrada.

De esta manera el método de WO 2004/083432 es mejorado.

En otra forma de realización de la divulgación las selecciones son realizadas simultáneamente.

5 [0083] Sin desear quedar limitado por ninguna teoría es actualmente pensado que el uso de un oligonucleótido dirigido a un sitio de unión a SR proteínas resulta (al menos parcialmente) en perjudicar la unión de una SR proteína al sitio de unión de una SR proteína que produce empalme interrumpido o perjudicado.

10 [0084] Preferiblemente, una estructura abierta/cerrada y un sitio de unión a proteínas SR parcialmente se superponen e incluso más preferido una estructura abierta/cerrada superpone completamente un sitio de unión a proteínas SR o un sitio de unión a proteínas SR superpone completamente una estructura abierta/cerrada. Esto permite una interrupción mejorada de inclusión de exón.

15 [0085] Además secuencias de sitios de empalme de consenso, muchos (si no todos) exones contienen secuencias reguladoras de empalme tal como secuencias de empalme exónico intensificador (ESE) para facilitar el reconocimiento de sitios de empalme genuinos por la espliceosoma^{42,43}.

Un subgrupo de factores de empalme, llamado proteínas SR, pueden enlazar con estos ESE y reclutar otros factores de empalme, tales como U1 y U2AF a sitios de empalme (débilmente definidos).

20 Los sitios de unión de las cuatro más abundantes proteínas SR (SF2/ASF, SC35; SRp40 y SRp55) han sido analizados en detalle y estos resultados se implementan en ESEfinder, una fuente de Internet que predice sitios de unión potenciales para estas proteínas SR^{42, 43}.

Hay una correlación entre la eficacia de un AON y la presencia/ausencia de un sitio de unión SF2/ASF, SC35 y SRp40.

25 En una forma de realización preferida, la divulgación así proporciona un método, combinación, uso o producto farmacéutico como se ha descrito anteriormente, donde dicha proteína SR es SF2/ASF o SC35 o SRp40.

[0086] En una forma de realización de la divulgación, se proporciona a un paciente con DMD una proteína distrofina funcional usando un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que es capaz de específicamente unir una secuencia de ARN regulador que se requiere para el empalme correcto de un exón de distrofina en una transcripción.

30 Diferentes secuencias de ARN que actúan en cis se requieren para el empalme correcto de exones en una transcripción.

35 En particular, elementos suplementarios tales como potenciadores de empalme intrónico o exónico (ISE y ESE) o silenciadores (ISS y ESE) se identifican por ajustar empalme específico y eficaz de exones constitutivos y alternativos.

Usando oligonucleótidos antisentido específicos de secuencia (AON) que enlazan con los elementos, su función reguladora es perturbada de modo que el exón es omitido, como se muestra para DMD.

40 Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la divulgación, un equivalente oligonucleótido o funcional del mismo se usa que es complementario a un empalme intrónico intensificador (ISE), un empalme exónico intensificador (ESE), un silenciador de empalme intrónico (ISS) y/o un silenciador de empalme exónico (ESS).

Como ya descrito aquí antes, un exón de distrofina es en una forma de realización preferida omitido por un agente capaz de inhibir específicamente una señal de inclusión de exón de dicho exón, de modo que dicho exón no se reconoce por la maquinaria de empalme como una parte que necesita ser incluida en el ARNm.

45 Como resultado, un ARNm sin dicho exón es formado.

[0087] Un AON usado en un método de la presente divulgación es preferiblemente complementario a una parte consecutiva de entre 13 y 50 nucleótidos de exón de distrofina ARN o intrón de distrofina ARN.

50 En una forma de realización un AON usado en un método de la presente divulgación es complementario a una parte consecutiva de entre 16 y 50 nucleótidos de un exón de distrofina ARN o intrón de distrofina ARN.

Preferiblemente, dicho AON es complementario a una parte consecutiva de entre 15 y 25 nucleótidos de dicho exón ARN.

Más preferiblemente, un AON se usa que comprende una secuencia que es complementaria a una parte consecutiva de entre 20 y 25 nucleótidos de un exón de distrofina ARN o un intrón de distrofina ARN.

55 [0088] Diferentes tipos de ácido nucleico se pueden utilizar para generar el oligonucleótido.

Preferiblemente, dicho oligonucleótido comprende ARN, ya que híbridos de ARN/ARN son muy estables.

60 Ya que uno de los objetivos de la técnica de omisión de exón es dirigir el empalme en sujetos se prefieren que el ARN oligonucleótido comprende una modificación que proporciona el ARN con una propiedad adicional, por ejemplo resistencia para endonucleasas y RNaseH, fuerza de hibridación adicional, estabilidad aumentada (por ejemplo en un fluido corporal), flexibilidad aumentada o disminuida, toxicidad reducida, transporte intracelular aumentado, especificidad de tejido, etc. Preferiblemente dicha modificación comprende una modificación oligorribonucleotida 2'-O-metil-fosforotioato.

65 Preferiblemente dicha modificación comprende una modificación de oligodesoxirribonucleótido de fosforotioato 2'-O-metilo.

Una forma de realización así proporciona un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la invención, donde un oligonucleótido se usa que comprende ARN que contiene una modificación, preferiblemente una ribosa modificada de 2'-O-metilo (ARN) o modificación de deoxiribosa (ADN).

5 [0089] En una forma de realización de la divulgación proporciona un oligonucleótido híbrido comprendiendo un oligonucleótido que comprende una modificación de 2'-O-metil-fosforotioato de oligo(deoxi)ribonucleótido y ácido nucleico bloqueado.

Esta combinación particular comprende mejor especificidad de secuencia en comparación con un equivalente consistente en ácido nucleico bloqueado, y comprende efectividad mejorada cuando comparada con un
10 oligonucleótido consistente en modificación ribonucleótida 2'-O-metil-fosforotioato oligo(deoxi).

[0090] Con el descubrimiento de tecnología de imitación de ácido nucleico se ha hecho posible generar moléculas que tienen una características de hibridación similar, preferiblemente igual, en especie, no necesariamente en la cantidad como ácido nucleico mismo.

15 Tales equivalentes funcionales son por supuesto también adecuadas para usar en un método de la divulgación.

[0091] Ejemplos preferidos de equivalentes funcionales de un oligonucleótido son ácido nucleico de péptido y/o ácido nucleico bloqueado.

De la forma más preferible, una fosforodiamidada de morfolino se usa.

20 Ejemplos no limitativos adecuados pero de equivalentes de oligonucleótidos de la invención se pueden encontrar en 44-50

Híbridos entre uno o varios de los equivalentes entre ellos y/o junto con ácido nucleico son por supuesto también adecuados.

25 En una forma de realización preferida de la divulgación, ácido nucleico bloqueado se usa como un equivalente funcional de un oligonucleótido, ya que ácido nucleico bloqueado muestra una afinidad objetivo más alta y toxicidad reducida y por lo tanto muestra una eficiencia más alta de omisión de exón.

[0092] En una forma de realización de la divulgación un oligonucleótido, o un equivalente funcional del mismo, que es capaz de inhibir inclusión de un exón de distrofina en la distrofina ARNm se combina con al menos otro oligonucleótido, o equivalente funcional del mismo, que es capaz de inhibir inclusión de otro exón de distrofina en la distrofina ARNm.

De esta manera, inclusión de dos o más exones de un pre-ARNm de distrofina en el ARNm producido de este pre-ARNm es evitada.

35 Esta forma de realización de la divulgación es posteriormente referida como omisión doble o multi-exón^{2,15}.

En la mayoría de los casos omisión de exón doble produce la exclusión de solo los dos exones objetivo del pre-ARNm de distrofina.

Sin embargo, en otros casos se ha observado que los exones objetivo y toda la región en medio de dichos exones en dicho pre-ARNm no estaban presentes en el ARNm producido incluso cuando otros exones (exones de intervención) estaban presentes en tal región.

40 Esta multi-omisión fue sobre todo así para la combinación de oligonucleótidos derivados del gen DMD, donde un oligonucleótido para exón 45 y un oligonucleótido para exón 51 se añadió a una célula que transcribe el gen de DMD.

Tal configuración resultó en el ARNm que no contenía exones 45 a 51 siendo producido.

45 Aparentemente, la estructura del pre-ARNm en presencia de los oligonucleótidos mencionados fue tal que la maquinaria de empalme fue estimulada para conectar exones 44 y 52 entre sí.

[0093] Además proporcionado es por lo tanto un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la divulgación, donde una secuencia de nucleótidos se usa que comprende al menos 8, preferiblemente entre 16 y 80, nucleótidos consecutivos que son complementarios a un primer exón de un pre-ARNm de distrofina y donde se usa una secuencia de nucleótidos que comprende al menos 8, preferiblemente entre 16 a 80, nucleótidos consecutivos que son complementarios a un segundo exón de dicho pre-ARNm de distrofina.

50 [0094] En una forma de realización preferida de la divulgación dicho primer y dicho segundo exón son separados en dicho pre-ARNm de distrofina por al menos un exón al que dicho oligonucleótido no es complementario.

55 [0095] Según la divulgación, es posible específicamente promover la omisión de también los exones de intervención mediante una conexión entre los dos oligonucleótidos complementarios.

Por lo tanto, en una forma de realización extensiones de nucleótidos complementarios a por lo menos dos exones de distrofina se separan por una fracción de conexión.

60 Al menos dos extensiones de nucleótidos son así enlazados en esta forma de realización para formar una única molécula.

Además proporcionado es por lo tanto un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la divulgación donde dicho oligonucleótido, o equivalente funcional del mismo, para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional es complementario a por lo menos dos exones en un pre-ARNm de distrofina, donde dicho equivalente oligonucleótido o funcional comprende al menos dos partes donde una primera parte comprende un oligonucleótido teniendo al menos 8, preferiblemente entre 16 y 80, nucleótidos consecutivos que son

complementarios a un primero de dicho al menos dos exones y donde una segunda parte comprende un oligonucleótido con al menos 8, preferiblemente entre 16 a 80, nucleótidos consecutivos que son complementarios a un segundo exón en dicho pre-ARNm de distrofina.

Según la divulgación, la conexión puede ser a través de cualquier medio pero es preferiblemente realizada a través de una conexión de nucleótido.

En este último caso el número de nucleótidos que no contienen un recubrimiento entre uno u otro exón complementario pueden ser cero, pero es preferiblemente entre 4 a 40 nucleótidos.

La fracción de conexión puede ser cualquier tipo de fracción capaz de conectar oligonucleótidos.

Preferiblemente en la divulgación, dicha fracción de conexión comprende al menos 4 nucleótidos de uracilo.

Actualmente, muchos compuestos diferentes están disponibles que imitan características de hibridación de oligonucleótidos.

Tal compuesto, llamado aquí un equivalente funcional de un oligonucleótido, es también adecuado para la presente divulgación si tal equivalente comprende en especie características de hibridación similares no necesariamente en la cantidad.

Equivalentes funcionales adecuados son mencionados antes en esta descripción.

Tal y como se menciona, oligonucleótidos de la divulgación no tienen que consistir en solo oligonucleótidos que contribuyen a la hibridación al exón objetivo.

Puede haber material adicional y/o nucleótidos añadidos.

[0096] El gen de DMD es un gen grande, con muchos exones diferentes.

Considerando que el gen se localiza en el cromosoma X, son en sus mayoría niños los que son afectados, aunque niñas también pueden ser afectadas por la enfermedad, ya que puede recibir una copia mala del gen de ambos padres, o padecen de una inactivación particularmente diagonal del alelo funcional debido a una inactivación particularmente sesgada de cromosoma X en sus células musculares.

La proteína es codificada por una pluralidad de exones (79) en una gama de al menos 2,6 Mb.

Defectos pueden ocurrir en cualquier parte del gen de DMD.

Omisión de un exón particular o exones particulares pueden, muy a menudo, suponer un ARNm reestructurado que codifica una proteína distrofina más corta de lo normal pero al menos parcialmente funcional.

Un problema práctico en el desarrollo de un medicamento basado en tecnología de omisión de exón es la pluralidad de mutaciones que pueden suponer una deficiencia en la proteína distrofina funcional en la célula.

A pesar del hecho de que ya varias mutaciones se pueden corregir mediante la omisión de un único exón, esta pluralidad de mutaciones requiere la generación de un gran número de diferentes fármacos en cuanto a exones diferentes de mutaciones diferentes necesitan ser omitidos.

Una ventaja de un compuesto capaz de inducir omisión de dos o más exones, es que más de un exón se puede omitir con un único fármaco.

Esta propiedad no es solo prácticamente muy útil en que solo un número limitado de fármacos necesita ser generado para tratar muchas mutaciones de DMD diferentes o de BMD particulares severas.

Otra opción ahora abierto al experto en la técnica es escoger proteínas de distrofina reestructurada particularmente funcional y producir compuestos capaces de generar estas proteínas de distrofina preferidas.

Tales resultados finales preferidos son además referidos como distrofinas de fenotipo moderado.

[0097] Cada compuesto, un oligonucleótido y/o un compuesto complementario tal y como se define aquí para uso según la presente divulgación se puede adecuar para administración directa a una célula, tejido y/o un órgano in vivo de individuos afectados o a riesgo de desarrollar DMD o BMD, y se puede administrar directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

[0098] Alternativamente, medios adecuados para suministrar células con un oligonucleótido o equivalente de los mismos están presentes en la técnica. Un equivalente oligonucleótido o funcional del mismo puede por ejemplo ser proporcionado a una célula en forma de un vector de expresión donde el vector de expresión codifica una transcripción que comprende dicho oligonucleótido.

El vector de expresión es preferiblemente introducido en la célula vía un vehículo de entrega de gen.

Un vehículo de entrega preferido es un vector vírico tal como un vector viral adeno-asociado (AAV) o un vector retrovírico tal como un vector lentivirus^{4, 51, 52} y similar.

También plásmidos, cromosomas artificiales, plásmidos adecuados para recombinación homóloga dirigida e integración en el genoma humano de células pueden ser adecuadamente aplicados para entrega de un oligonucleótido tal y como se define aquí.

Preferido para la actual divulgación son aquellos vectores donde transcripción es conducida de promotores PolIII, y/o donde transcripciones están en las fusiones de forma con transcripciones U1 o U7, que producen buenos resultados entregando transcripciones pequeñas.

Está en la habilidad del artesano diseñar transcripciones adecuadas.

Preferido son transcripciones conducidas por PolIII.

Preferiblemente en forma de una transcripción de fusión con una transcripción U1 o U7^{4, 51, 52}.

Tales fusiones se pueden generar como se describe^{53, 54}.

El oligonucleótido se puede entregar como es.

Sin embargo, el oligonucleótido también puede ser codificado por el vector vírico.

Típicamente esto es en forma de un transcrito de ARN que comprende la secuencia del oligonucleótido en una parte de la transcripción.

5 [0099] Mejoras en medios para suministrar células con un oligonucleótido o equivalente de las mismas, son anticipadas considerando el avance que ya ha sido hasta ahora conseguido. Tales mejoras futuras pueden por supuesto ser incorporadas para conseguir el efecto mencionado en la reestructuración de ARNm que utiliza un método de la divulgación.

10 [0100] El oligonucleótido o equivalente del mismo se puede entregar como es a las células. Al administrar el oligonucleótido o equivalente del mismo a un individuo, se prefiere que el oligonucleótido sea disuelto en una solución que es compatible con el método de entrega.

Para administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intraventricular se prefiere que la solución sea una solución salina fisiológica.

15 Particularmente preferido para un método de la divulgación es el uso de un excipiente que ayudará en la entrega de un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario a una célula y en una célula, preferiblemente una célula muscular.

Preferidos son excipientes capaces de formar complejos, vesículas y/o liposomas que entregan tal compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario complejo o retenido en una vesícula o liposoma a través de una membrana celular.

20 Muchos de estos excipientes se conocen en la técnica. Excipientes adecuados comprenden polietilenimina (PEI), o polímeros catiónicos similares, incluyendo polipropiliminina o copolímeros de polietilenimina (PECs) y derivados, ExGen 500, anfifilos sintéticos (SAINT-18), lipofectin™, proteínas cápsidas DOTAP y/o víricas que son capaces de auto ensamblaje en partículas que pueden entregar tales compuestos, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario tal y como se define aquí a una célula, preferiblemente una célula muscular.

25 Tales excipientes han mostrados eficazmente entregar (oligonucleótido tal como antisentido) ácidos nucleicos a una amplia variedad de células cultivadas, incluyendo células musculares.

Su potencial de transfección alta se combina con una toxicidad exceptuada de baja a moderada en cuanto a supervivencia de célula total.

30 La facilidad de modificación estructural puede utilizarse para permitir otras modificaciones y el análisis de sus además (en vivo) características de transferencia de ácido nucleico y toxicidad.

[0101] Lipofectina representa un ejemplo de un agente de transfección liposómica.

35 Consiste en dos componentes lipídicos, un lípido catiónico N-[1-(2,3 dioleoiloxi)propil]-N,N,Cloruro de n-trimetilamonio (DOTMA) (cp).

DOTAP que es la sal de metilsulfato) y una dioleoilfosfatidiletanolamina de lípido neutral (DOPE).

El componente neutral media la liberación intracelular.

Otro grupo de sistemas de entrega son nanopartículas poliméricas.

40 [0102] Policationes tales como dietilaminoetilaminoetilo DEAE)-dextrano, que son bien conocidas como reactivo de transfección de ADN se puede combinar con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden entregar un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario a través de membranas celulares en células.

45 [0103] Además de estos materiales de nanopartícula comunes, la protamina de péptido catiónico ofrece un método alternativo para formular un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario como coloides.

50 Este sistema de nanopartícula coloidal puede formar así llamados proticles, que se puede preparar por un simple proceso de autoensamblaje para embalaje y mediar liberación intracelular de un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario.

55 La persona experta puede seleccionar y adaptar cualquiera del anterior u otros excipientes alternativos disponibles comercialmente y sistemas de entrega para embalaje y entrega de un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario para su uso para entregar dicho compuesto para el tratamiento de distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en seres humanos.

60 [0104] Además, un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario podría ser de manera covalente o de manera covalente enlazado a un ligando de objetivo específicamente diseñado para facilitar la comprensión en la célula, citoplasma y/o su núcleo.

65 Tal ligando podría comprender (i) un compuesto (incluyendo pero no limitado a estructuras de péptidos o tipo péptido) reconociendo elementos específicos de célula, tejido u órgano facilitando consumo celular y/o (ii) un compuesto químico capaz de facilitar la absorción en células y/o la liberación intracelular de un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario de vesículas, por ejemplo endosomas o lisosomas.

[0105] Por lo tanto, en una forma de realización preferida de la divulgación, un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario se formulan en un medicamento que dispone de al menos un excipiente y/o un ligando objetivo para entrega y/o un dispositivo de entrega de dicho compuesto a una célula y/o aumentando su entrega intracelular.

5 Por consiguiente, la presente divulgación también abarca una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto tal y como se define aquí, preferiblemente un oligonucleótido y opcionalmente junto con un compuesto complementario y además que comprende al menos un excipiente y/o un ligando objetivo para entrega y/o un dispositivo de entrega de dicho compuesto a una célula y/o aumentando su entrega intracelular. Debe entenderse que un oligonucleótido y un compuesto complementario no se puede formular en una composición o preparación única.
10 Dependiendo de su identidad, la persona experta conocerá que tipo de formulación es el más apropiado para cada compuesto.

15 [0106] En una forma de realización preferida la divulgación proporciona un kit de partes que comprende un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional y un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir inflamación de tejido muscular , y/o un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular.

20 [0107] En una forma de realización preferida de la divulgación, una concentración de un oligonucleótido tal y como se define aquí, que oscila entre aproximadamente 0,1 nM y aproximadamente 1 μM, se usa. Más preferiblemente, la concentración usada oscila entre aproximadamente 0,3 y aproximadamente 400 nM, aún más preferiblemente entre aproximadamente 1 y aproximadamente 200 nM. Si diferentes oligonucleótidos se usan, esta concentración puede referirse a la concentración total de oligonucleótidos o la concentración de cada oligonucleótido añadido.
25 Las gamas de concentración de oligonucleótidos como dadas arriba son concentraciones preferidas para usos *in vitro* o *ex vivo*.

La persona experta entenderá que dependiendo del oligonucleótidos usado, la célula objetivo a ser tratada, el gen objetivo y sus niveles de expresión, el medio usado y la transfección y condiciones de incubación, la concentración de oligonucleótidos usado puede variar además y puede necesitar ser optimizada además.
30

[0108] Más preferiblemente, un compuesto, preferiblemente un oligonucleótido y un compuesto complementario para usarse para prevenir o tratar DMD o BMD, es sintéticamente producido y administrado directamente a una célula, un tejido, un órgano y/o pacientes en la forma formulada en una composición o preparación farmacéuticamente aceptable.
35 La entrega de una composición farmacéutica al sujeto es preferiblemente realizada por una o varias inyecciones parenterales, por ejemplo administraciones intravenosas y/o subcutáneas y/o intramusculares y/o intratecales y/o intraventriculares, preferiblemente inyecciones a uno o múltiples sitios en el cuerpo humano.

40 [0109] Además de omisión de exón la presente divulgación proporciona la comprensión, también es posible proporcionar un paciente de DMD con una proteína distrofina funcional con una terapia basada en translectura de codones de parada.

Compuestos capaces de suprimir codones de parada son especialmente adecuados para un subgrupo de pacientes con DMD que es afectado por mutaciones sin sentido (~7%) dando como resultado la formación de un codón de parada dentro de su gen de distrofina.

45 En una forma de realización de la divulgación dicho compuesto capaz de suprimir codones de parada comprende la gentamicina antibiótica.

En un estudio reciente en ratones *mdx*, tratamiento de gentamicina indujo expresión de distrofina nueva hasta 20% del nivel normal, sin embargo con variabilidad entre animales.

Ensayos humanos con gentamicina han sido sin embargo no concluyentes⁵⁵.

50 PTC124 pertenece a una clase nueva de moléculas pequeñas que imita a concentraciones inferiores la actividad de translectura de la gentamicina.

Administración de PTC124 resultó en la producción de distrofina funcionalmente activa de longitud completa tanto *in vitro* y en ratones *mdx*¹⁶.

55 Ensayos fase I/II con PTC124 están actualmente en curso, no solo para aplicación en DMD sino también para fibrosis quística^{16,17}.

Las referencias 16 y 17 también describen dosificaciones preferidas del PCT124 compuesto para usar en la presente divulgación.

Además proporcionado es por lo tanto un método, combinación, uso o producto farmacéutico según la divulgación, donde dicho compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional comprende un compuesto para suprimir codones de parada.
60

Dicho compuesto para suprimir codones de parada preferiblemente comprende gentamicina, PTC124 o un equivalente funcional de estos.

De la forma más preferible, dicho compuesto comprende PTC124.

65 [0110] En una forma de realización de la divulgación, un individuo dispone de una proteína distrofina funcional que utiliza un vector, preferiblemente un vector vírico, que comprende un gen de micro-mini-distrofina.

De la forma más preferible, se usa un vector vírico adeno-asociado recombinante (rAAV).

AAV es un parvovirus de ADN monocatenario que es no patógeno y muestra un ciclo de vida colaborador-dependiente.

A diferencia de otros virus (adenovirus, retrovirus, y virus herpes simplex), vectores rAAV han demostrado ser muy eficaces en el músculo esquelético maduro de transducción.

Aplicación de rAAV en estudios "adición de gen" de DMD tradicionales ha sido obstaculizada por sus restringidos límites de empaquetado (< 5 kb).

Por lo tanto, rAAV es preferiblemente aplicado para la entrega eficaz de un gen mucho más pequeño de micro o mini-distrofina.

Administración de tal gen de micro o mini-distrofina produce la presencia de una proteína distrofina al menos parcialmente funcional.

Se hace referencia a ¹⁸⁻²⁰.

[0111] Un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional y al menos un compuesto complementario según la invención se pueden administrar a un individuo en cualquier orden.

En una forma de realización, dicho compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional y dicho al menos un compuesto complementario se administran simultáneamente (lo que significa que dichos compuestos se administran dentro de 10 horas, preferiblemente dentro de una hora).

Este es sin embargo no necesario.

En una forma de realización al menos un compuesto complementario se administra a un individuo en la necesidad del mismo antes administración de un compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional.

También se describe por lo tanto un método que comprende:

- administración a un individuo en necesidad de un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir la inflamación de tejido muscular, y/o administración a dicho individuo de un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular y, posteriormente,
- administración a dicho individuo de un compuesto para suministrar a dicho individuo una proteína distrofina funcional.

[0112] En otra forma de realización, dicho compuesto para suministrar a un individuo una proteína distrofina funcional se administra antes de la administración de dicho al menos uno compuesto complementario.

[0113] Además proporcionado es un método para al menos en parte que aumentar la producción de una proteína distrofina funcional en una célula, dicha célula que comprende pre-ARNm un gen de distrofina que codifica una proteína aberrante de distrofina, donde el método comprende:

- proporcionar a dicha célula un compuesto para inhibir inclusión de un exón en el ARNm producido del empalme de dicho pre-ARNm de distrofina, y proporcionar a dicha célula un compuesto complementario para reducir la inflamación, preferiblemente para reducir inflamación de tejido muscular, y/o proporcionar a dicha célula un compuesto complementario para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de fibra muscular, donde el método comprende además permitir el movimiento de ARNm producido de empalme de dicho pre-ARNm.

En una forma de realización de la divulgación dicho método se realiza *in vitro*, por ejemplo utilizando un cultivo celular.

[0114] En este contexto, aumentar la producción de una proteína distrofina funcional ha sido anteriormente definido aquí.

[0115] A menos que se indique lo contrario cada forma de realización como se describe en este caso se puede combinar con otra forma de realización como se describe en este caso.

[0116] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que artículos después de la palabra son incluidos, pero artículos no específicamente mencionados no son excluidos.

Además el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en", lo que significa que un compuesto o compuesto complementario tal y como se define aquí puede comprender componentes adicional además de aquellos específicamente identificados, dicho componentes adicional no alterando la característica única de la divulgación.

[0117] Además, referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno" no excluye la posibilidad de que más de uno del elemento esté presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos.

El artículo indefinido "un" o "uno" así normalmente significa "al menos uno".

[0118] La palabra "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10, alrededor de 10) preferiblemente significa que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos 1% del valor.

5 [0119] La invención es posteriormente explicada en los siguientes ejemplos.
Estos ejemplos no limitan el ámbito de la invención, sino que meramente sirven para clarificar la invención.

Breve descripción de los dibujos

10 [0120]

Figura 1. Representación esquemática de omisión de exón.

En un paciente con distrofia muscular de Duchenne que tiene una supresión de exón 50, se genera una transcripción fuera del marco en que exón 49 se empalma a exón 51 (Panel A).

15 Como resultado, un codón de parada se genera en exón 51, que aborta prematuramente síntesis de distrofina.

La unión específica de secuencia del oligonucleótido antisentido interno de exón PRO051 interfiere con la inclusión correcta de exón 51 durante empalme de modo que el exón es en realidad omitido (Panel B).

Esto restaura el marco de lectura abierto de la transcripción y permite la síntesis de una distrofina similar a la de pacientes con distrofia muscular de Becker (BMD).

20 Figura 2. Preselección de estudios de los cuatro pacientes.

Imágenes de resonancia magnética de las piernas inferiores de los cuatro pacientes (a la izquierda pierna de paciente 3 y piernas adecuadas de los otros tres pacientes) muestran la condición adecuada del músculo anterior tibial (menos del 50% infiltración de grasa y fibrosis) (Panel A).

25 El diagnóstico de distrofia muscular de Duchenne en estos pacientes fue confirmado por coloración de tetrahidrocloruro de diaminobenzidina de secciones transversales de muestras de biopsia obtenidas previamente del músculo de cuádriceps (Panel B).

Ninguna expresión de distrofina fue observada, con la excepción de una fibra en el paciente 2 positiva de distrofina, o revertiente (flecha).

Reacción en cadena de transcriptasa-polimerasa-inversa (RT-PCR)

30 Análisis de la región de transcripción que flanquea las mutaciones de los pacientes y exón 51 confirmó las mutaciones individuales en miotubos no tratados (NT) y la respuesta positiva para PRO051 (es decir, omisión de exón 51) en miotubos tratados (T) en el nivel de ARN (Panel C).

Los rendimientos de omisión de exón fueron 49% para paciente 1, 84% para paciente 2, 58% para paciente 3, y 90% para paciente 4.

35 Un sitio de empalme críptico dentro de exón 51 es a veces activado por PRO051 en el cultivo celular, dando como resultado un producto de empalme aberrante extra, como se ha visto en la muestra tratada de paciente 4.

Vía M muestra un marcador de tamaño 100-bp, y vía C ARN muscular de control saludable.

40 Análisis de secuencias de los fragmentos RT-PCR de miotubos tratados y no tratados identificó la omisión precisa de exón 51 para cada paciente (Panel D).

Los nuevos transcritos dentro del marco de lectura llevaron a síntesis de distrofina sustancial, como detectado por análisis de inmunofluorescencia de miotubos tratados con el uso de anticuerpo monoclonal NCL-DYS2 (Panel E).

Ninguna distrofina fue detectada antes del tratamiento

45 Figura 3. Análisis RT-PCR de ARN aislado de secciones en serie de muestras de biopsia de los pacientes.

Después del tratamiento con PRO051, análisis de reacción en cadena de polimerasa transcriptasa inversa (RT-PCR) muestra fragmentos de transcripción nuevos más cortos para cada paciente.

El tamaño y secuencia de estos fragmentos apoyan la omisión precisa de exón 51.

50 Ninguna variantes de empalme adicional fue observada.

A 28 días, transcripciones de ARN dentro del marco de lectura todavía significativas fueron detectadas, sugiriendo persistencia prolongada de PRO051 en el músculo.

Debido a la pequeña cantidad de material de sección, condiciones RCP de sensibilidad alta fueron usadas; este proceso excluyó la cuantificación precisa de rendimientos de omisión y la correlación significativa entre niveles de ARN y proteína.

55 M denota marcador de tamaño, y C control.

Figura 4. Efecto restaurador de distrofina de una única dosis intramuscular de PRO051.

Análisis de inmunofluorescencia con el uso del anticuerpo de distrofina MANDYS106 claramente muestra expresión distrofina en las membranas de la mayoría de fibras en toda la muestra de biopsia obtenida de cada paciente (Panel A).

60 Las áreas indicadas por las escuadras se muestran en la ampliación más alta en el Panel B. En comparación, una muestra de un paciente no tratado con distrofia muscular de Duchenne (DMD) y una muestra de control saludable muscular de gastrocnemio (HC) se incluye en las muestras de los pacientes.

Fibras revertientes putativas se indican por flechas.

65 El número total de fibra muscular que contenía distrofina y laminina $\alpha 2$ fueron contados manualmente y las proporciones de distrofina para laminina $\alpha 2$ fueron fijadas (Panel C).

Análisis de electrotransferencia de extractos de proteína total aislados de las muestras de biopsia de los pacientes con el uso de anticuerpo NCL-DYS1 muestra expresión de distrofina restaurada en todos pacientes (Panel E).

5 Para cada paciente, 30 µg (vía derecha) y 60 µg (vía izquierda) fueron cargadas; en comparación, 3 µg de proteína total de una muestra muscular de gastrocnemio saludable fueron también cargados (para evitar sobreexposición).

Debido a las supresiones relativamente pequeñas en el gen DMD de estos pacientes, ninguna de las diferencias fueron observadas en los tamaños de proteína.

En el paciente 1, una irregularidad de transferencia perturbó la detección de señal en la vía 60-µg.

10 Para corregir por la densidad variable de fibra muscular en las secciones transversales diferentes, la señal de distrofina fluorescente total (porcentaje de área) en cada sección fue fijada como una proporción al porcentaje de área de laminina α2 (Panel D).

Figura 5 de ejemplo de referencia.

15 Niveles de omisión de exón 23 en el nivel de ARN en diferentes grupos musculares (Q: músculo de cuádriceps; TA: músculo anterior tibial; DIA: músculo de diafragma) en ratones *mdx* (dos ratones por grupo) tratados con PS49 solo (grupo 3) o con PS49 y prednisolona (group4).

Figura 6A,B de ejemplo de referencia en células musculares, exón de gen DMD 44 (A) o exón 45 (B) niveles de omisión se mejoran con concentraciones en aumento de pentoxifilina (de 0 a 0,5 mg/ml).

20 Los niveles de omisión de exón de figura 6C 23 en el nivel de ARN en diferentes grupos musculares (Q: músculo de cuádriceps; TA: músculo anterior tibial; Tri: músculo de tríceps; HRT: músculo cardiaco) en ratones *mdx* (dos ratones por grupo) tratadas con PS49 solo (grupo 3) o con PS49 y pentoxifilina (grupo 4).

Figura 7. Secuencia de aminoácidos de gen de distrofina (DMD)

Figura 8 de ejemplo de referencia.

Secuencia de amino ácido de Isoforma 4 de IGF-1 humano.

25 Figura 9 de ejemplo de referencia.

Varios oligonucleótidos dirigidos contra los exones indicados del gen de distrofina (DMD)

Ejemplos

30 Ejemplo 1

[0121] En un estudio clínico reciente la seguridad, tolerabilidad, y efecto restaurador local de distrofina del compuesto de antisentido PRO051 fueron evaluados.

El estudio clínico fue recientemente publicado.

35 El contenido de la publicación es reproducida aquí como ejemplo 1A.

En resumen, PRO051 es un, molécula de ARN sintética modificada con secuencia 5'-UCA AGG AAG AUG GCA UUU CU-3', y diseñada para específicamente inducir omisión del exón 51⁵⁹.

Lleva fracciones de ribosa sustituida de 2'-O-metilo de longitud completa y uniones de internucleótido de fosforotioato.

40 Cuatro pacientes con DMD con supresiones de gen DMD específicas diferentes corregibles por omisión de exón 51 fueron incluidos.

A día 0, una serie de parámetros de seguridad fueron evaluados.

La pierna del paciente (es decir músculo anterior tibial) fue fijada con un molde de plástico hecho a medida y su posición fue cuidadosamente registrada.

45 Un anestésico tópico (EMLA) fue usado para entumecer la piel.

Cuatro inyecciones de PRO051 fueron dadas a lo largo de una línea de ruta de 1,5 cm entre dos tatuajes de piel pequeña, usando una aguja electromiográfica de 2,5 cm (MyoJect Disposable Hypodermic Needle Electrode, TECA Accessories) para asegurar la entrega intramuscular.

50 Cada volumen de inyección fue 200 µl, que contiene 200 µg PRO051, dispersado en partes iguales a ángulos de aproximadamente 30 grados.

A día 28, la misma serie de parámetros de seguridad fue evaluada nuevamente.

La pierna fue posicionada utilizando el molde propio del paciente, y una biopsia muscular semi-abierta fue tomada entre los tatuajes con anestesia local que utiliza unos fórceps con dos mordazas afiladas (Blakesley Conchotoma, DK Instruments).

55 La biopsia fue congelada rápidamente en el 2-metilbutano enfriado en nitrógeno líquido.

Pacientes fueron tratados consecutivamente.

Cuando el estudio, dos pacientes (nr. 1 y 2) estaban también en corticosteroides (prednisona o deflazacort), uno acababa de terminar tratamiento de esteroide (nr.4) y un paciente había usado nunca esteroide (nr.3) (ver tabla 1).

60 Este último paciente fue también el que perdió ambulancia en la edad más joven cuando se compara con los otros tres pacientes.

La biopsia fue analizada, para detectar omisión de exón específico en el nivel de ARN (RT análisis PCR, no mostrado) y expresión nueva de distrofina en el nivel de proteína (análisis de inmunofluorescencia y electrotransferencia²⁵, resumido en la tabla 1).

65 Evaluación de la serie de parámetros de seguridad (parámetros de plasma y orina rutinarios para renal y función de hígado, niveles de electrolito, cuentas de célula sanguínea, hemoglobina, valores aPTT, AP50 y CH50) antes y después del tratamiento, indicó que el compuesto PRO051 fue localmente seguro y bien tolerado.

Para análisis de inmunofluorescencia, secciones transversales fijadas con acetona de la biopsia fueron incubadas durante 90 minutos con anticuerpos monoclonales contra el dominio de varilla central (MANDYS106, Dr. G. Morris, UK, 1:60), el dominio C-terminal (NCL-DYS2, Novocastra Laboratories Ltd., 1:30) o, como referencia, laminina- α 2 (Chemicon International, Inc, 1:150),

5 seguido de anticuerpo IgG anti-ratón de cabra (H+L) Alexa flúor 488 (Molecular Probes, Inc, 1:250) durante una hora.

Secciones fueron montadas con Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories Inc.).

Para análisis de imagen cuantitativo se usó el software ImageJ (W. Rasband, NIH, EE.UU; <http://rsb.info.nih.gov/ij>) como descrito 60,61.

10 Secciones transversales enteras fueron subdivididas en la serie de 6-10 imágenes adyacentes, dependiendo del tamaño de sección.

Para asegurar mediciones fiables, coloración de las secciones y registro de todas imágenes fue realizado en una sesión, utilizando ajustes de exposición fijados, y evitando saturación de píxeles.

15 El umbral de intensidad inferior fue fijado en el fondo de distrofia muscular de Duchenne, y fluorescencia positiva fue cuantificada para cada sección (porcentaje de área), tanto para distrofina como laminina- α 2.

Análisis de electrotransferencia fue realizado como descrito ¹, utilizando homogenizados agrupados de conjuntos de cuatro secciones 50 μ m en serie en toda la biopsia.

Para los pacientes 30 y 60 μ g proteína total fueron aplicados y para la muestra de control 3 μ g.

20 La mancha fue incubada durante toda la noche con anticuerpo monoclonal de distrofina NCL-DYS1 (Novocastra Laboratories, 1:125), seguido de IgG-HRP anti-ratón de cabra (Santa Cruz Biotechnology, 1:10.000) durante una hora.

Bandas inmunoreactivas fueron visualizadas utilizando el CL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare) y Hyperfilm ECL (Amersham, Biosciences).

Intensidades de señal fueron medidas utilizando ImageJ.

25 Expresión de proteína distrofina nueva en el sarcolema fue detectada en la mayoría de fibra muscular en el área tratada en los cuatro pacientes.

Las fibras en cada sección fueron manualmente contadas tras la coloración para laminina- α 2, una proteína de lámina basal inafectada por deficiencia de distrofina.

30 Los números individuales variaron, de acuerdo con el tamaño de biopsia y la calidad de los músculos de los pacientes.

En las secciones más grande, paciente 2 tenía 726 fibras, de las cuales 620 fueron positivas en distrofina, mientras paciente 3 tenía 120 fibras, de las cuales 117 fueron positivas en distrofina.

Las intensidades de distrofina fueron típicamente inferiores a aquellas en una biopsia muscular saludable.

35 Análisis de electrotransferencia²⁶ confirmó la presencia de distrofina en cantidades variables.

Las señales de distrofina fueron escaneadas y correlacionadas al control (por μ g proteína total).

Las cantidades variaron de 3% en el paciente 3 con el músculo más distrófico, a 12% en el paciente 2 con el músculo mejor conservado.

Ya que tal comparación basada en proteína total no corrige para las cantidades variables de tejido fibrótico y adiposo en los pacientes de distrofia muscular de Duchenne, también cuantificamos la señal de fluorescencia de distrofina con respecto a la laminin- α 2 situada de forma similar en cada sección, por análisis ImageJ.

40 Cuando esta proporción de distrofina/laminina- α 2 fue fijada a 100% para la sección de control, los dos pacientes que fueron co-tratados con corticosteroides mostraron los máximos porcentajes de distrofina, 32% en el paciente 1 y 35% en el paciente 2 (tabla 1).

El porcentaje mínimo de distrofina fue detectado en el paciente 3, 17%.

45 En el paciente 4 un porcentaje intermedio de 25% fue observado.

Estos porcentajes se correlacionaron a la calidad relativa del músculo objetivo, que fue mejor en pacientes n° 1 y 2, y peor en el paciente n° 3.

Tabla 1.				
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Edad (años)	10	13	13	11
Edad a pérdida de ambulación (años)	9	11	7	10
Tratamiento de esteroides	Sí	Sí	Nunca	Hasta enero 2006
Proporción laminina distrofina-alfa2	32%	35%	17%	25%

50 [0122] Conclusión: el efecto del compuesto antisentido PRO051 fue más prominente en aquellos pacientes que fueron también sometidos a corticosteroides.

Ejemplo 1A

55 [0123] Reproducido Van Deutekom JC et al, (2007) Antisense Oligonucleotide PRO051 Restores Local Dystrophin in DMD Patients. N Engl J Med., 357(26): 2677-86 .

Métodos

Pacientes y diseño de estudio

- 5 [0124] Pacientes con distrofia muscular de Duchenne que tenían entre 8 y 16 años de edad fueron aceptables para participar en el estudio.
 Todos los pacientes tenían supresiones que eran corregibles por omisión de exón 51 y no tenían ninguna muestra de distrofina en la biopsia muscular del diagnóstico precedente.
 Tratamiento de glucocorticoide concurrente fue permitido.
- 10 Consentimiento informado escrito se obtuvo de los pacientes o sus padres, según fuera apropiado.
 Durante el periodo de preselección (alrededor de 60 días), cada estado mutacional del paciente y respuesta de omisión de exón positivo para PRO051 *in vitro* fueron confirmados, y la condición del músculo anterior tibial fue determinado por formación de imágenes por resonancia magnética de T1 de peso (MRI).⁶² Para que pacientes fueran incluidos en el estudio, tejido fibrótico y adiposo podría componer no más de 50% de su músculo objetivo.
- 15 [0125] Durante la visita de referencia, medidas de seguridad fueron evaluadas.
 En cada paciente, la pierna que iba a ser inyectada fue fijada con un molde de plástico hecho a medida y su posición fue registrada.
 Una mezcla euéctica tópica de anestésicos locales (EMLA) fue usada para entumecer la piel.
- 20 Cuatro inyecciones de PRO051 fueron dadas a lo largo de una línea de medición de 1,5 cm situada entre dos tatuajes de piel pequeños con el uso de una aguja electromiográfica de 2.5 cm (MyoJect Disposable Hypodermic Needle Electrode, TECA Accessories) para asegurar entrega intramuscular.
 El volumen de cada inyección fue 200 µl conteniendo 200 µg de PRO051, que fue dispersado en partes iguales a ángulos de aproximadamente 30 grados.
- 25 [0126] A día 28, medidas de seguridad fueron evaluadas nuevamente.
 La pierna que había sido inyectada fue posicionada con el uso del molde propio del paciente, y una biopsia muscular semiabierto fue realizada entre los tatuajes bajo anestesia local con unos fórceps con dos mordazas afiladas (Blakesley Conchotoma, DK Instruments).⁶³ La muestra de biopsia fue congelada rápidamente en el 2-metilbutano enfriado en el nitrógeno líquido.
- 30 [0127] Pacientes fueron tratados consecutivamente desde mayo 2006 hasta marzo 2007 y conforme a las buenas pautas de práctica clínica (Good Clinical Practice) y las provisiones de la declaración de Helsinki.
 El estudio fue aprobado por el comité Dutch Central Committee on Research Involving Human Subjects y por la junta de revisión institucional local del Leiden University Medical Center.
- 35 Todos autores contribuyeron al diseño de estudio, participaron en la recolección y análisis de los datos, tuvieron acceso completo y libre a los datos, juntamente escribieron el manuscrito, y certifican la completitud y exactitud de los datos y analisis presentados.
- 40 Descripción de PR0051
- [0128] PRO051 es una molécula sintética de ARN modificada con secuencia 5'-UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU-3'.¹² Lleva moléculas de ribosa 2'-O-metil-sustituida de longitud completa y uniones de internucleótido de fosforotioato.
- 45 El fármaco fue proporcionado por Prosensa B.V. en viales de 1 mg de material liofilizado sin excipiente.
 Fue disuelto y administrado en solución salina estéril sin conservantes (0,9% cloruro de sodio).
 Se descubrió que PRO051 no era mutagénico por prueba bacteriana Ames.
 En los estudios reguladores de seguridad Good Laboratory Practice, ratas que recibieron una única administración de hasta 8 mg por kilogramo de peso corporal intramuscularmente y 50 mg por kilogramo por vía intravenosa no mostraron ningún efecto adverso; monos que recibieron PRO051 durante 1 mes parecieron aguantar dosis hasta 16 mg por kilogramo por semana cuando el fármaco fue administradas por infusión intravenosa de 1 hora o por inyección subcutánea, sin efectos adversos clínicamente pertinentes.
- 50
- 55 Preselección In vitro
- [0129] Un cultivo de mioblasto primario preexistente¹ fue usado para la preselección de paciente 4.
 Para los otros tres pacientes, fibroblastos fueron convertidos en células miogénicas tras la infección con un vector adenoviral que contiene el gen para el factor de transcripción miogénica (myoD) como se describe con anterioridad.^{1, 64, 65} Cultivos de miotubo fueron modificados con PRO051 (100 nM) y polietilenimina (2 µl por microgramo de PRO051), según las instrucciones del fabricante para ExGen500 (MBI Fermentas).
 ARN fue aislado después de 48 horas.
 Análisis de reacción en cadena de polimerasa de transcriptasa inversa (RT, pCR) inmunofluorescencia, y electrotransferencia fueron realizados como proporcionado con anterioridad^{1,12}. Fragmentos de la PCR fueron analizados con el uso del 2100 bioanalizador (Agilent) y aislados para secuenciación por el Leiden Genome Technology Center.
- 65

Evaluación de seguridad

[0130] En la línea de referencia y a 2 horas, 1 día, y 28 días después de la inyección, todos pacientes han recibido un examen físico completo (con la medición de constantes vitales) y fueron sometidos a electrocardiografía.

5 Además, plasma y orina fueron obtenidos para determinar función renal y de hígado, niveles de electrolitos, cuentas de célula completa, el tiempo de tromboplastina parcial activada, y valores de actividad de complemento en las vías tradicionales (CH50) y alternativas (AP50).

El uso de medicamentos concomitantes fue registrado.

10 En la línea de referencia y en el día 28, la fuerza del músculo anterior tibial fue evaluada con el uso de la escala del Medical Research Council ⁶⁶ para evaluar si los procedimientos habían afectado al rendimiento muscular. (En esta escala, una puntuación de 0 indica ningún movimiento y una puntuación de 5 indica fuerza muscular normal.) Como solo una área pequeña del músculo fue tratada, no fue previsto beneficio clínico en cuanto a fuerza muscular aumentada.

15 A cada visita, eventos adversos fueron registrados.

Evaluación de ARN

[0131] Secciones en serie (50 μm) de la muestra de biopsia muscular congelada fueron homogeneizadas en la solución de ARN-Bee (Campro Scientific) y MagNA Lyser Green Beads (Roche Diagnostics).

20 ARN total fue aislado y purificado según las instrucciones del fabricante.

Para DNA complementario, síntesis fue realizada con transcriptasa inversa Transcriptor (Roche Diagnostics) con el uso de 500 ng de ARN en una reacción de 20- μl a 55°C durante 30 minutos con cebadores inversos específicos de exón humano 53 o 54.

25 Análisis PCR fueron realizados como se describe con anterioridad^{1,12}. Productos fueron analizados en geles de agarosa 2% y secuenciados.

Además, RT-PCR con el uso de un cebador establecido para la prueba de truncamiento de proteína⁶⁷ fue usado para rápidamente filtrar para eventos específicos de empalme aberrante en todo el gen *DMD*.

Evaluación de nivel de proteína

30 [0132] Para análisis de inmunofluorescencia, secciones fijadas con acetona fueron incubadas durante 90 minutos con anticuerpos monoclonales contra el dominio de varilla central (MANDYS106, Dr. G. Morris, Reino Unido) a una dilución de 1:60, el dominio C-terminal (NCL-DYS2, Novocastra Laboratories) a una dilución de 1:30, o (como una referencia) laminina $\alpha 2$ (Chemicon internacional), una proteína de lámina basal que se inafecta por deficiencia de distrofina, a una dilución de 1:150, seguido de anticuerpos IgG (H+L) antiratón de cabra Alexa flúor 488 (Molecular Probes) a una dilución de 1:250 durante 1 hora.

Secciones fueron montadas con Vectashield Mounting Medium (Vector Laboratories).

35 ImageJ software (W. Rasband, National Institutes of Health, <http://rsb.info.nih.gov/ij>) fue usado para análisis de imagen cuantitativo como se describe con anterioridad.^{60,61} Secciones transversales enteras fueron subdivididas en series de 6 a 10 imágenes adyacentes, dependiendo del tamaño de la sección.

40 Para asegurar mediciones fiables, coloración de las secciones y registro de todas las imágenes fueron realizados durante una sesión con el uso de ajustes de exposición fijados y la evitación de saturación de píxeles.

45 El umbral de intensidad inferior fue establecido al fondo para distrofia muscular de Duchenne, y fluorescencia positiva fue cuantificada para cada sección (porcentaje de área), tanto para distrofina como laminina $\alpha 2$.

[0133] Análisis de electrotransferencia²⁸ fue realizado como se describe con anterioridad¹ con el uso de homogenizados agrupados de conjuntos de cuatro secciones en serie 50- μm en toda la muestra de biopsia.

Para cada paciente, dos cantidades de proteína total - 30 μg y 60 μg - fueron aplicadas, y para la muestra de control, 3 μg .

50 El inmunoblot (análisis de electrotransferencia) fue incubado durante toda la noche con anticuerpo monoclonal de distrofina NCL-DYS1 (Novocastra Laboratories) a una dilución de 1:125, seguido de IgG antiratón de cabra marcado con peroxidasa de rábano picante (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:10,000 durante 1 hora.

Bandas inmunoreactivas fueron visualizadas con el uso del sistema de detección de electrotransferencia ECL Plus Western blotting detection system (GE Healthcare) y Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences).

55 Intensidades de señal fueron medidas con el uso del software ImageJ.

Resultados

Preseleccionar de pacientes

60 [0134] El estudio fue planificado para incluir de cuatro a seis pacientes. Seis pacientes fueron invitados a participar, y uno declinó la invitación.

Los restante cinco pacientes fueron preseleccionados. Primero, la condición del músculo anterior tibial fue evaluada en MRI.

65 Se consideró que la condición muscular de cuatro pacientes era adecuada para el estudio (figura 2A), y la ausencia de distrofina fue confirmada en las muestras de biopsia original de los pacientes (figura 2B).

Segundo, el estado mutacional y respuesta de omisión de exón positivo para PRO051 de estos cuatro pacientes fueron confirmados en los cultivos de fibroblasto.

Tratamiento PRO051 ha generado un nuevo fragmento de ARN más corto mensajero para cada paciente, representando de 46% (en el paciente 4) a 90% (en el paciente 1) del producto RT-PCR total (figura 2C).

5 Omisión precisa de exon 51 fue confirmada por secuenciación (figura 2D).

No se descubrió que otras regiones de transcripción fueran alteradas.

Análisis de inmunofluorescencia mostraron una preponderancia de miotubos positivos de distrofina (figura 2E), un hallazgo que fue confirmado por análisis de electrotransferencia (no mostrado).

Así, los cuatro pacientes fueron juzgados aceptables para tratamiento PRO051.

10 Sus características de línea de referencia se muestran en la tabla 2.

Seguridad y eventos adversos

[0135] Todos los pacientes tuvieron uno o varios eventos adversos.

15 Sin embargo, solo un paciente informó de dolor local moderado en el sitio de inyección, que fue considerado un evento adverso relacionado con el fármaco de estudio.

Otros eventos incluyeron dolor de leve a moderado después de la biopsia muscular.

Dos pacientes tuvieron formación de ampollas bajo los vendajes usados para cierre de la herida.

20 En el periodo entre inyección y biopsia, dos pacientes informaron de unos días de síntomas tipo gripe, y un paciente tuvo diarrea moderada durante 1 día.

En la línea de referencia, las puntuaciones de fuerza muscular del músculo anterior tibial tratado en pacientes 1, 2, 3, y 4 fueron respectivamente 4, 2, 3, y 4, en la escala del Medical Research Council.

25 Ninguno de los pacientes mostró cambios en la fuerza de este músculo durante el estudio o alteraciones significativas en las medidas de laboratorio estándares o medidas aumentadas de productos de empalme de complemento o tiempo de tromboplastina parcial activado.

Ninguna respuesta inflamatoria local o tóxica fue detectada en las secciones de músculo de los pacientes (datos no mostrado).

Paciente 3 exitosamente fue sometido a cirugía preplanificada para escoliosis en el mes después de que el estudio fuera completado.

30 ARN y nivel de proteína

[0136] A día 28, una biopsia del área tratada fue realizada en cada paciente.

Músculo total ARN fue aislado de secciones en serie en toda la muestra de biopsia.

35 En todos los pacientes, RT-PCR identificó un fragmento nuevo más corto provocado por la omisión de exon-51 como confirmado por secuenciación (figura 3).

Un análisis más detallado de transcripción no mostró otras alteraciones (datos no mostrados).

Análisis de inmunofluorescencia de secciones a lo largo de la muestra de biopsia de cada paciente mostraron señales claras del sarcolema de distrofina en la mayoría de las fibras musculares (figura 4A y 4B).

40 Anticuerpos de distrofina proximal y distal a las supresiones que fueron usadas incluyeron MANDYS106 (figura 4A y 4B) y NCL-DYS2 (similar al MANDYS106, no mostrado).

Las fibras en cada sección fueron manualmente contadas tras la coloración para laminina $\alpha 2$.⁶⁸ Los números individuales variaron, de acuerdo con el tamaño de la muestra de biopsia y la calidad del músculo.

45 En las secciones más grandes, paciente 2 tenía 726 fibras, de las cuales 620 fueron positivas en distrofina, mientras que paciente 3 tenía 120 fibras, de las cuales 117 fueron positivas en distrofina (figura 4A y 4C).

Las intensidades de distrofina fueron típicamente inferiores a aquellas en una muestra de biopsia muscular saludable (figura 4B).

Las fibras únicas con una señal de distrofina más intensa en pacientes 2 y 3 podrían ser bien fibras revertientes (figura 4B).

50 [0137] Análisis de electrotransferencia confirmó la presencia de distrofina en cantidades variables (figura 4E). Las señales de distrofina fueron escaneadas y correlacionadas al control (por microgramo de proteína total).

Las cantidades variaron de 3% en el paciente 3, que tenía el músculo más-distrofíco, a 12% en el paciente 2, que tenía el músculo mejor conservado.

55 Ya que tal comparación basándose en proteína total no corrige para las cantidades variables de tejido fibrótico y adiposo en pacientes con distrofia muscular de Duchenne, también cuantificamos la señal de fluorescencia de distrofina (figura 4A y 4B) con respecto a la de la laminina $\alpha 2$ situada de forma similar en cada sección por análisis ImageJ.

60 Cuando la proporción de distrofina para laminina $\alpha 2$ fue establecida a 100 para la sección de control, pacientes 1, 2, 3, y 4 tuvieron proporciones de 33, 35, 17, y 25, respectivamente (figura 4D).

Discusión

65 [0138] Nuestro estudio mostró que inyección intramuscular local de PRO051, un oligorribonucleotido antisentido 2OMeP complementario a una secuencia de 20 nucleótidos dentro de exón 51, indujo omisión de exon-51, corrigió el

marco de lectura, y así indujo distrofina en el músculo en los cuatro pacientes con distrofia muscular de Duchenne que recibieron terapia.

Fibras positivas de distrofina fueron descubiertas en las muestras de biopsia de los pacientes, lo que indica la dispersión del compuesto en el área inyectada.

5 Ya que ningún excipiente de mejora de entrega fue usado, comprensión PRO051 no ha parecido ser un factor potencialmente limitante mayor.

No podemos excluir que permeabilidad aumentada de la membrana de fibra distrófica tuviera un efecto favorable.

Los pacientes produjeron niveles de distrofina que fueron de 3 a 12% del nivel en el músculo de control saludable, como se muestra en el análisis de electrotransferencia de proteína total.

10 Ya que la presencia de fibrosis y grasa puede llevar a alguna subestimación de distrofina en extractos de proteína total, determinamos la proporción de distrofina para laminina $\alpha 2$ en las secciones transversales, que osciló de 17 a 35, en comparación con 100 en el músculo de control.

El efecto restaurador de distrofina de PRO051 fue limitado al área tratada, y ninguna mejora de fuerza del músculo entero fue observada.

15 Tratamiento sistémico futuro requerirá administración repetida para aumentar y mantener expresión de distrofina a un nivel más alto y para obtener eficacia clínica.

[0139] Debido a reglamentos de ética médica con relación a intervenciones en menores, no pudimos obtener una muestra de biopsia de los músculos contralaterales de los pacientes que no habían sido inyectados.

20 Sin embargo, los pacientes mostraron menos del 1% de fibras revertientes en las muestras de biopsia de diagnóstico original obtenidos de 5 a 9 años antes de la iniciación del estudio (tabla 2 y figura 2B).

Consideramos muy posible que los efectos que observamos estuvieran relacionados con la naturaleza y secuencia del PRO051 reactivo en vez de con un aumento marcado en fibras revertientes.

25 De hecho, una única fibra posiblemente revertiente que tenía una señal de distrofina aumentada fue observada en tanto paciente 2 como paciente 3 (figura 4B).

[0140] En resumen, nuestro estudio mostró que administración local de PRO051 a músculo en cuatro pacientes con distrofia muscular de Duchenne restauró la distrofina a niveles que varían de 3 a 12% o 17 a 35%, dependiendo de la cuantificación relativa a proteína total o contenido de miofibra.

30 De acuerdo con la naturaleza claramente localizada del tratamiento, mejora funcional no se observó.

El resultado consistentemente más pobre en el paciente 3, que tenía la enfermedad más avanzada, sugiere la importancia de llevar a cabo ensayos clínicos en pacientes a una edad relativamente joven, cuando relativamente poco tejido muscular ha sido sustituido por fibrosis y tejido adiposo.

35 Nuestras conclusiones proporcionan una indicación de que omisión de exón mediado de antisentido pueden ser un método potencial para restaurar síntesis de distrofina en los músculos de pacientes con distrofia muscular de Duchenne.

Ejemplo 2: ejemplo de referencia

40 [0141] En un estudio preclínico en ratones *mdx* (modelo animal para DMD) el efecto de prednisona de compuesto complementario en la omisión de exón inducido por AON fue evaluado.

Ratones *Mdx* (C57Bl/10ScSn-*mdx*/J) fueron obtenidos de Charles River Laboratories (Países Bajos).

Estos ratones son deficientes en distrofina debido a un mutación sin sentido en el exón 23.

45 Omisión de exón inducida por AON 23 es terapéutica en ratones *mdx* eliminando la mutación sin sentido y la corrección del marco de lectura abierto.

Se inyectó subcutáneamente a dos ratones *mdx* por grupo con: grupo 1) sal fisiológica (semanas 1- 8), grupo 2) prednisolona (1mg/kg, semanas 1-8), grupo 3) oligonucleótido PS49 antisentido específico de ratón diseñado para específicamente inducir omisión de exón 23 (100mg/kg, semana 4 (5 veces), semana 5-8 (2 veces), grupo 4) prednisolona (1mg/kg, semana 1-8) + PS49 (100mg/kg, semana 4 (5 veces), semana 5-8 (2 veces).

50 PS49 (5' GGCCAAACCUCGGCUUACCU 3') tiene un esqueleto de fosforotioato de longitud completa y moléculas de ribosa modificada de 2'O-metilo.

[0142] Todos los ratones fueron sacrificados 1 semana después de la última inyección.

55 Grupos de músculos diferentes, incluyendo cuádriceps, anterior tibial, y músculos de diafragma fueron aislados y congelados en el 2-metilbutano enfriado en nitrógeno líquido.

Para análisis RT-PCR, las muestras musculares fueron homogeneizadas en la solución de RNA-Bee (Campro Scientific, Países Bajos).

ARN total fue aislado y purificado según las instrucciones del fabricante.

60 Para síntesis de ADNc con transcriptasa inversa (Roche Diagnostics, Países Bajos), 300 ng de ARN fue usado en una reacción 20 μ l a 55°C durante 30 min, inverso cebado con cebadores específicos de gen DMD de ratón.

Primero PCR fueron realizados con conjuntos de cebador externo, durante 20 ciclos de 94°C (40 seg), 60°C (40 seg), y 72°C (60 seg).

Un μ l de esta reacción (diluida 1:10) fue luego reamplificada utilizando combinaciones de cebador anidado en los exones directamente flanqueando exón 23, con 30 ciclos de 94°C (40 seg), 60°C (40 seg), y 72°C (60 seg).

65 Productos PCR fueron analizados en 2% geles de agarosa.

Rendimientos de omisión fueron determinados por cuantificación de productos PCR que utilizan el DNA 1000 LabChip® Kit y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Países Bajos).

Ninguna omisión de exón 23 fue observada en los músculos de ratones tratados con sal fisiológica o prednisolona solo (grupos 1 y 2).

5 Niveles de omisión de exón 23 fueron detectados y comparados por grupo muscular entre ratones tratados con PS49 solo (grupo 3) y ratones tratados con PS49 y prednisolona de compuesto complementario (grupo 4).

En los músculos cuádriceps (Q), anterior tibial (TA), y diafragma (DIA), niveles de omisión de exón 23 fueron típicamente más altos en el grupo 4 cuando se compara con grupo 3 (figura 5).

10 Esto indica que prednisolona de compuesto complementario de hecho mejora niveles de omisión de exón 23 en ratones *mdx* tratados con PS49.

Ejemplo 3: ejemplo de referencia

15 [0143] A., B. Cultivos de células muscular diferenciado (miotubos) derivados de un individuo de control saludable fueron modificados con 250 nM PS188 ([5' UCAGCUUCUGUUAGCCACUG 3'; SEC ID n.º: 10] un AON optimizado para específicamente omitir exón 44) o 250 nM PS221 ([5' AUUCA AUGUUCUGACAACAGUUUGC 3'; SEC ID n.º: 60] un AON optimizado para específicamente omitir exón 45) en presencia de 0 a 0,5 mg/ml pentoxifilina, uso de del polímero de reactivo de transfección UNIFectilin (2,0 µl UNIFectilin por µg AON en 0,15M NaCl).

20 UNIFectilin interactúa electrostáticamente con ácidos nucleicos, a condición que el ácido nucleico se carga negativamente (tal como AON de fosforotioato de 2'-O-metilo).

Pentoxifilina (Sigma Aldrich) fue disuelta en agua.

ARN total fue aislado 24 hrs tras la transfección en la solución de RNA-Bee (Campro Scientific, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante.

25 Para síntesis de ADNc con transcriptasa inversa (Roche Diagnostics, Países Bajos), 500 ng de ARN fue usado en una reacción 20 µl a 55°C durante 30 min, cebado inverso con cebadores específicos de gen DMD.

Primero PCR fueron realizados con conjuntos de cebador externos, durante 20 ciclos de 94°C (40 seg), 60°C (40 seg), y 72°C (60 seg).

30 Un µl de esta reacción (diluido 1:10) fue luego reamplificado utilizando combinaciones de cebador anidado en los exones directamente flanqueando exón 44 o 45, con 30 ciclos de 94°C (40 seg), 60°C (40 seg), y 72°C (60 seg).

Productos PCR fueron analizados en 2% geles de agarosa.

Rendimientos de omisión fueron determinados por cuantificación de productos PCR utilizando el DNA 1000 LabChip® Kit y el bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Países Bajos).

35 [0144] Tanto con PS188 como PS221, niveles en aumento de exón 44 o 45 omisión fueron obtenidos con concentraciones en aumento de la pentoxifilina de compuesto complementario cuando se compara con aquellos obtenidos en células que no eran co-tratadas con pentoxifilina (ver figura 6).

Estos resultados indican que pentoxifilina mejora niveles de omisión de exón en el músculo células.

C.

40 [0145] En un estudio preclínico en ratones *mdx* (modelo animal para DMD) el efecto de pentoxifilina de compuesto complementario en la omisión de exón inducido por AON fue evaluado.

Ratones *Mdx* (C57Bl/10ScSn-*mdx*/J) fueron obtenidos de Charles River Laboratories (Países Bajos).

Estos ratones son deficientes en distrofina debido a un mutación sin sentido en el exón 23.

45 Omisión de exón inducido por AON 23 es terapéutico en ratones *mdx* eliminando la mutación sin sentido y corrección del marco de lectura abierto.

Dos ratones *mdx* por grupo fueron inyectados subcutáneamente con: grupo 1) pentoxifilina (50 mg/kg, semana 1-2), grupo 2) oligonucleótido PS49 antisentido específico de ratón diseñado para específicamente inducir omisión de exón 23 (100mg/kg, semana 2 (2 veces), grupo 3) pentoxifilina (50 mg/kg, semana 1-2) + PS49 (100mg/kg, semana 2 (2 veces).

50 PS49 (5' GGCCAAACCUCGGCUUACCU 3') tiene un esqueleto de fosforotioato de longitud completa y moléculas de ribosa modificada de 2'O-metilo.

[0146] Todos los ratones fueron sacrificados 1 semana después de la última inyección.

55 Grupos de músculos diferentes, incluyendo cuádriceps, tibial anterior, tríceps y músculos cardiacos fueron aislados y congelados en el 2-metilbutano enfriado en nitrógeno líquido.

Para análisis RT-PCR, las muestras musculares fueron homogeneizadas en la solución de RNA-Bee (Campro Scientific, Países Bajos).

ARN total fue aislado y purificado según las instrucciones del fabricante.

60 Para síntesis de ADNc con transcriptasa inversa (Roche Diagnostics, Países Bajos), 300 ng de ARN fue usado en una reacción 20 µl a 55°C durante 30 min, cebado inverso con cebadores específicos de gen DMD de ratón.

Primero PCR fueron realizados con conjuntos de cebador externo, durante 20 ciclos de 94°C (40 seg), 60°C (40 seg), y 72°C (60 seg).

65 Un µl de esta reacción (diluido 1:10) fue luego reamplificada utilizando combinaciones de cebador anidado en los exones directamente flanqueando exón 23, con 30 ciclos de 94°C (40 seg), 60°C (40 seg), y 72°C (60 seg).

Productos PCR fueron analizados en 2% geles de agarosa.

Rendimientos de omisión fueron determinados por cuantificación de productos PCR utilizando el DNA 1000 LabChip® Kit y el bioanalizador de Agilent 2100 (Agilent Technologies, Países Bajos).

Ninguna omisión de exón 23 fue observada en los músculos de ratones tratados con pentoxifilina solo (grupos 1).

Niveles de omisión de exón 23 fueron detectados y comparados por grupo muscular entre ratones tratados con PS49 solo (grupo 2) y ratones tratados con PS49 y pentoxifilina de compuesto complementario (grupo 3).

En el cuádriceps (Q), anterior tibial (TA), tríceps (tri) y músculos cardíacos (HRT), los niveles de omisión de exón 23 fueron típicamente más altos en el grupo 3 cuando se compara con grupo 2 (figura 6c).

Esto indica que pentoxifilina de compuesto complementario de hecho mejora los niveles de omisión de exón 23 en ratones *mdx* tratados con PS49.

10

Tabla 2. Características de línea de referencia de los pacientes con DMD				
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3	Paciente 4
Edad (años)	10	13	13	11
Supresión	Exón 50	Exones 48-50	Exones 49-50	Exón 52
Edad a la pérdida de ambulación (años)	9	11	7	10
Escoliosis	No	No	Sí	Sí
Niveles de creatina-cinasa (U/l) ¹	5823	2531	717	4711
Tratamiento de esteroides	Sí	Sí	Nunca	Hasta enero 2006
Fuerza músculo TA (escala MRC)	4	2	3	4
Estado MRI músculo TA	Moderado ²	Moderado ²	Moderado ²	Moderado ²
% fibras revertientes	N.D	<1%	N.D.	
¹ nivel normal: <200 U/l				
² menos del 50% infiltración de grasa y/o fibrosis [Mercuri et al., 2005]				

Referencias

[0147]

15 1. Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, et al. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 2003;12(8):907-14 .

2. 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 .

20 3. Alter J, Lou F, Rabinowitz A, et al. Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat Med* 2006;12(2):175-7 .

4. Goyenvalle A, Vulin A, Fougousse F, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* 2004;306(5702):1796-9 .

5. Lu QL, Mann CJ, Lou F, et al. Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the *mdx* dystrophic mouse. *Nat Med* 2003;6:6 .

25 6. Lu QL, Rabinowitz A, Chen YC, et al. Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(1):198-203 .

7. McClorey G, Fall AM, Moulton HM, et al. Induced dystrophin exon skipping in human muscle explants. *Neuromuscul Disord* 2006;16(9-10):583-90 .

8. McClorey G, Moulton HM, Iversen PL, et al. Antisense oligonucleotide-induced exon skipping restores dystrophin expression in vitro in a canine model of DMD. *Gene Ther* 2006;13(19):1373-81 .

30 9. Pramono ZA, Takeshima Y, Alimsardjono H, Ishii A, Takeda S, Matsuo M. Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226(2):445-9 .

10. Takeshima Y, Yagi M, Wada H, et al. Intravenous infusion of an antisense oligonucleotide results in exon skipping in muscle dystrophin mRNA of Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr Res* 2006;59(5):690-4 .

35 11. van Deutekom JC, Bremmer-Bout M, Janson AA, et al. Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 2001;10(15): 1547-54 .

12. Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson A, den Dunnen J, van Ommen G, van Deutekom J. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2002;12 Suppl:S71-S77 .

40 13. Aartsma-Rus A, De Winter CL, Janson AA, et al. Functional analysis of 114 exon-internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 2005;15(4):284-97 .

14. Aartsma-Rus A, Janson AA, Heemskerk JA, CL de Winter, GJ Van Ommen, JC Van Deutekom. Therapeutic Modulation of DMD Splicing by Blocking Exonic Splicing Enhancer Sites with Antisense Oligonucleotides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2006;1082:74-6 .

45 15. 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 .

16. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 2007;447(7140):87-91 .
17. Hirawat S, Welch EM, Elfring GL, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers. *Journal of clinical pharmacology* 2007; 47(4):430-44 .
18. Wang B, Li J, Xiao X. Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(25):13714-9 .
19. Fabb SA, Wells DJ, Serpente P, Dickson G. Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum Mol Genet* 2002;11(7):733-41 .
20. Wang Z, Kuhr CS, Allen JM, et al. Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* 2007;15(6):1160-6 .
21. Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;2 .
22. Duboc D, Meune C, Pierre B, et al. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *American heart journal* 2007;154(3):596-602 .
23. Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, et al. Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat Med* 2007;13(2): 204-10 .
24. Grounds MD, Torrisi J. Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *Faseb J* 2004;18(6):676-82 .
25. Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006;16(9-10):591-602 .
26. Pierno S, Nico B, Burdi R, et al. Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach. *Neuropathology and applied neurobiology* 2007;33(3):344- 59 .
27. Musaro A, McCullagh K, Paul A, et al. Localized Igf-1 transgene expression sustains hypertrophy and regeneration in senescent skeletal muscle. *Nat Genet* 2001;27(2):195-200 .
28. Barton ER, Morris L, Musaro A, Rosenthal N, Sweeney HL. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J Cell Biol* 2002;157(1):137-48 .
29. Disatnik MH, Dhawan J, Yu Y, et al. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. *J Neurol Sci* 1998;161(1):77-84 .
30. Nelson SK, Bose SK, Grunwald GK, Myhill P, McCord JM. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. *Free radical biology & medicine* 2006;40(2):341-7 .
31. Hart PE, Lodi R, Rajagopalan B, et al. Antioxidant treatment of patients with Friedreich ataxia: four-year follow-up. *Archives of neurology* 2005;62(4):621-6 .
32. Rolland JF, De Luca A, Burdi R, Andretta F, Confalonieri P, Conte Camerino D. Overactivity of exercise-sensitive cation channels and their impaired modulation by IGF-1 in mdx native muscle fibers: beneficial effect of pentoxifylline. *Neurobiol Dis* 2006;24(3):466-74 .
33. Whitehead NP, Streamer M, Lusambili LI, Sachs F, Allen DG. Streptomycin reduces stretch-induced membrane permeability in muscles from mdx mice. *Neuromuscul Disord* 2006; 16(12):845-54 .
34. Badalamente MA, Stracher A. Delay of muscle degeneration and necrosis in mdx mice by calpain inhibition. *Muscle Nerve* 2000;23(1):106-11 .
35. Burdi R, Didonna MP, Pignol B, et al. First evaluation of the potential effectiveness in muscular dystrophy of a novel chimeric compound, BN 82270, acting as calpain-inhibitor and anti-oxidant. *Neuromuscul Disord* 2006;16(4):237-48 .
36. Bonuccelli G, Sotgia F, Schubert W, et al. Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am J Pathol* 2003;163(4):1663-75 .
37. Voisin V, Sebric C, Matecki S, et al. L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. *Neurobiol Dis* 2005;20(1):123-30 .
38. Soret J, Bakkour N, Maire S, et al. Selective modification of alternative splicing by indole derivatives that target serine-arginine-rich protein splicing factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8764-9 .
39. Mann CJ, Honeyman K, McClorey G, Fletcher S, Wilton SD. Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy. *J Gene Med* 2002;4(6):644-54 .
40. Graham IR, Hill VJ, Manoharan M, Inamati GB, Dickson G. Towards a therapeutic inhibition of dystrophin exon 23 splicing in mdx mouse muscle induced by antisense oligoribonucleotides (splicomers): target sequence optimisation using oligonucleotide arrays. *J Gene Med* 2004;6(10):1149-58 .
41. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J Mol Biol* 1999;288(5): 911-40 .
42. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002;3(4):285-98 .
43. Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003;31(13):3568-71 .

44. Braasch DA, Corey DR. Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem Biol* 2001;8(1):1-7 .
45. Braasch DA, Corey DR. Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry* 2002;41(14):4503-10 .
- 5 46. Elayadi AN, Corey DR. Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2001;2(4):558-61 .
47. Larsen HJ, Bentin T, Nielsen PE. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489(1):159-66 .
- 10 48. Summerton J. Morpholino antisense oligomers: the case for an RNase H-independent structural type. *Biochim Biophys Acta* 1999;1489(1):141-58 .
49. Summerton J, Weller D. Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1997;7(3):187-95 .
50. Wahlestedt C, Salmi P, Good L, et al. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(10):5633-8 .
- 15 51. De Angelis FG, Sthandier O, Berarducci B, et al. Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(14):9456-61 .
52. Denti MA, Rosa A, D'Antona G, et al. Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum Gene Ther* 20 2006;17(5):565-74 .
53. Gorman L, Suter D, Emerick V, Schumperli D, Kole R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(9):4929-34 .
54. Suter D, Tomasini R, Reber U, Gorman L, Kole R, Schumperli D. Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. *Hum Mol Genet* 1999;8(13):2415- 25 23 .
55. Wagner KR, Hamed S, Hadley DW, et al. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol* 2001;49(6):706-11 .
56. 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 .
- 30 57. Hodgetts S., et al, (2006), *Neuromuscular Disorders*, 16: 591-602 .
58. Manzur AY et al, (2008), *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy (review)*, Wiley publishers, The Cochrane collaboration .
59. Van Deutekom JC et al, (2007) Antisense Oligonucleotide PRO051 Restores Local Dystrophin in DMD Patients. *N Engl J Med.*, 357(26): 2677-86 .
- 35 60. Yuan H, Takeuchi E, Taylor GA, McLaughlin M, Brown D, Salant DJ. Nephrin dissociates from actin, and its expression is reduced in early experimental membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:946-56 .
61. Koop K, Bakker RC, Eikmans M, et al. Differentiation between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity by analysis of renal cortical mRNA. *Kindney Int* 2004;66:2038-46 .
- 40 62. Mercuri E, Bushby K, Ricci e., et al. Muscle MRI findings in patients with limb girdle muscular dystrophy with calpain 3 deficiency (LGMD2A) and early contractures. *Neuromuscul Disord* 2005;15:164-71 .
63. Dorph C, Nennesmo I, Lundberg IE. Percutaneous conchotome muscle biopsy: a useful diagnostic and assessment tool. *J Rheumatol* 2001;28:1591-9 .
64. Havenga MJ, Lemckert AA, Ophorst OJ, et al. Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol* 2002;76:4612-20 .
- 45 65. Roest PA, van der Tuijn AC, Ginjaar HB, et al. Application of in vitro Myo-differentiation of non-muscle cells to enhance gene expression and facilitate analysis of muscle proteins. *Neuromuscul Disord* 1996;6:195-202 .
66. John J. Grading of muscular power: comparison of MRC and analogue scales by physiotherapists. *Int J Rehabil Res* 1984;7:173-81 .
- 50 67. Roest PA, Roberts RG, van der Tuijn AC, Heikoop JC, van Ommen GJ, den Dunnen JT. Protein truncation test (PTT) to rapidly screen the DMD gene for translation terminating mutations. *Neuromuscul Disord* 1993;3:391-4 .
68. Cullen MJ, Walsh J, Roberds SL, Campbell KP. Ultrastructural localization of adhalin, alpha-dystroglycan and merosin in normal and dystrophic muscle. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22:30-7 .

REIVINDICACIONES

- 5 1. Combinación de:
- un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia que es complementaria a una parte de exón 51 de pre-ARNm de distrofina humana y dicho oligonucleótido se representa por SEC ID n.º: 204
y
- un compuesto complementario para reducir la inflamación, donde este compuesto comprende un esteroide, donde dicha combinación es para su uso como un medicamento, para aliviar uno o varios síntomas de distrofia muscular de Duchenne en dicho individuo.
- 10 2. Combinación para uso según la reivindicación 1, donde la ausencia de dicho exón de ARNm producida por dicha distrofina pre-ARNm genera una región de codificación para una proteína de distrofina funcional.
- 15 3. Combinación para uso según la reivindicación 1 o 2, donde dicho oligonucleótido comprende ARN.
4. Combinación para uso según la reivindicación 3, donde dicho ARN contiene una 2'-O-metilo ribosa modificada (ARN).
- 20 5. Combinación para uso según la reivindicación 3 o 4, donde dicho oligonucleótido es un 2'-O metilo oligorribonucleótido fosforotioato.
- 25 6. Combinación para uso según cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, donde dicho oligonucleótido es un ácido nucleico péptido, ácido nucleico bloqueado, fosforodiamidada de morfolino, o cualquier combinación de los mismos.
- 30 7. Un producto farmacéutico que comprende
- una combinación tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6
y
- un portador, adyuvante, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Fig 1a

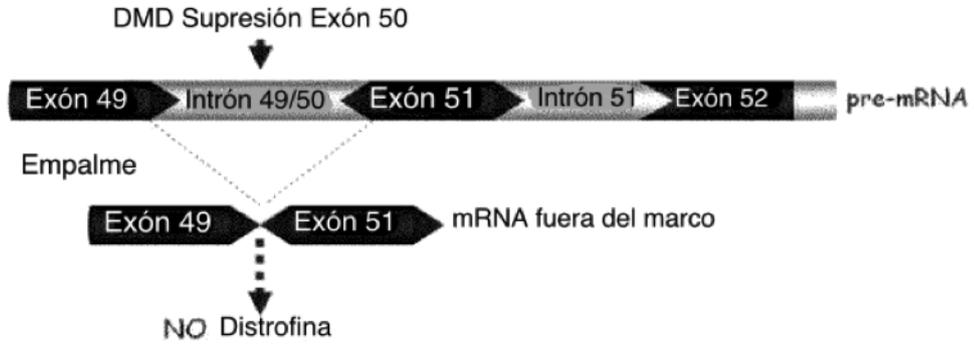


Fig 1b



Fig 2

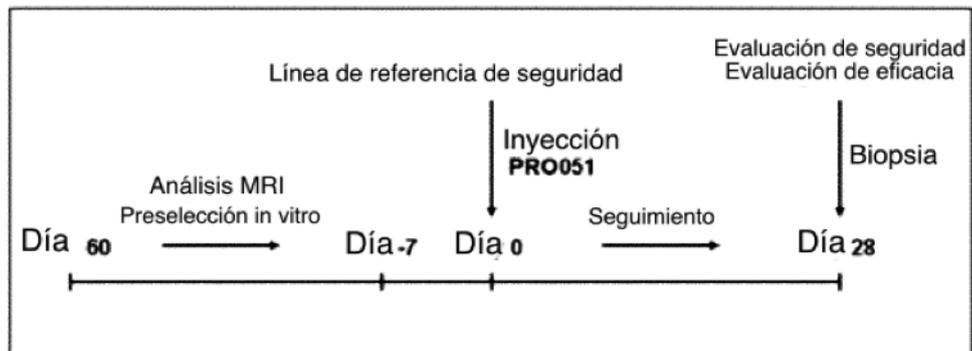


Fig 3a

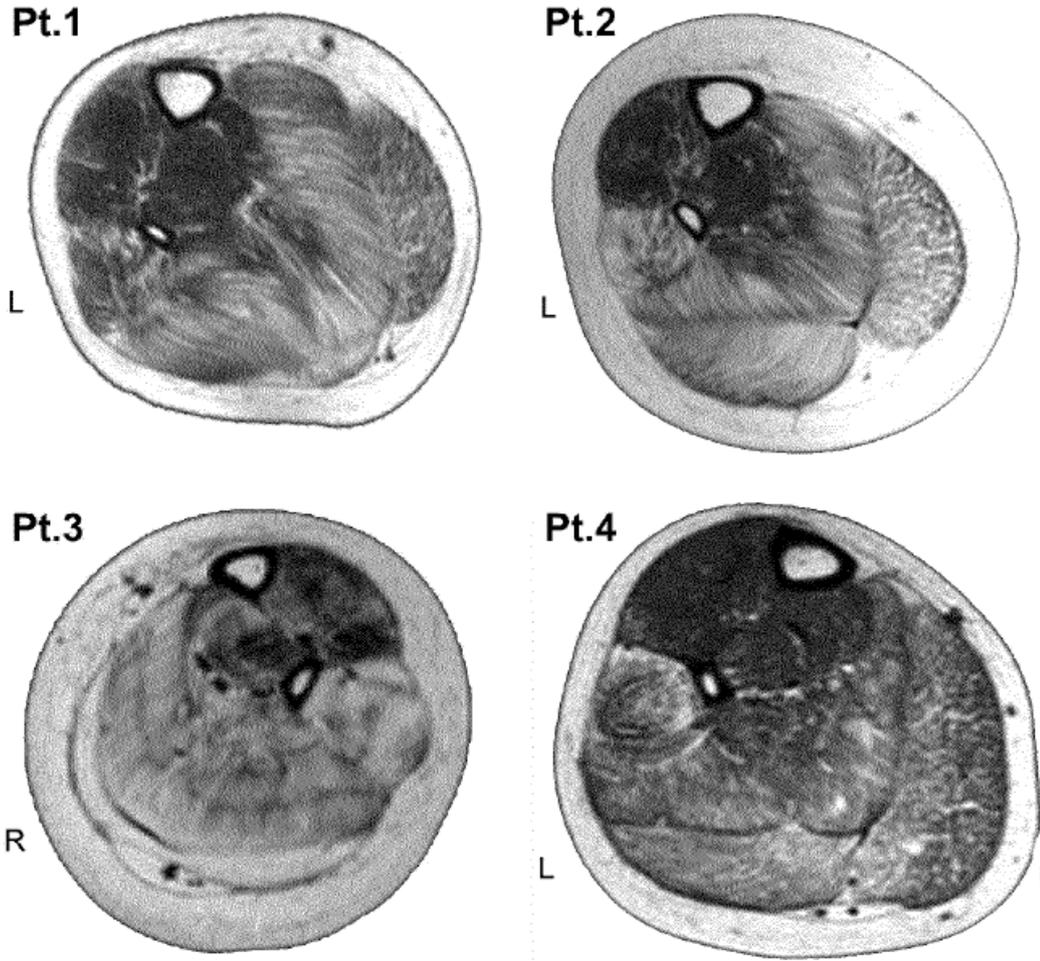


Fig 3b

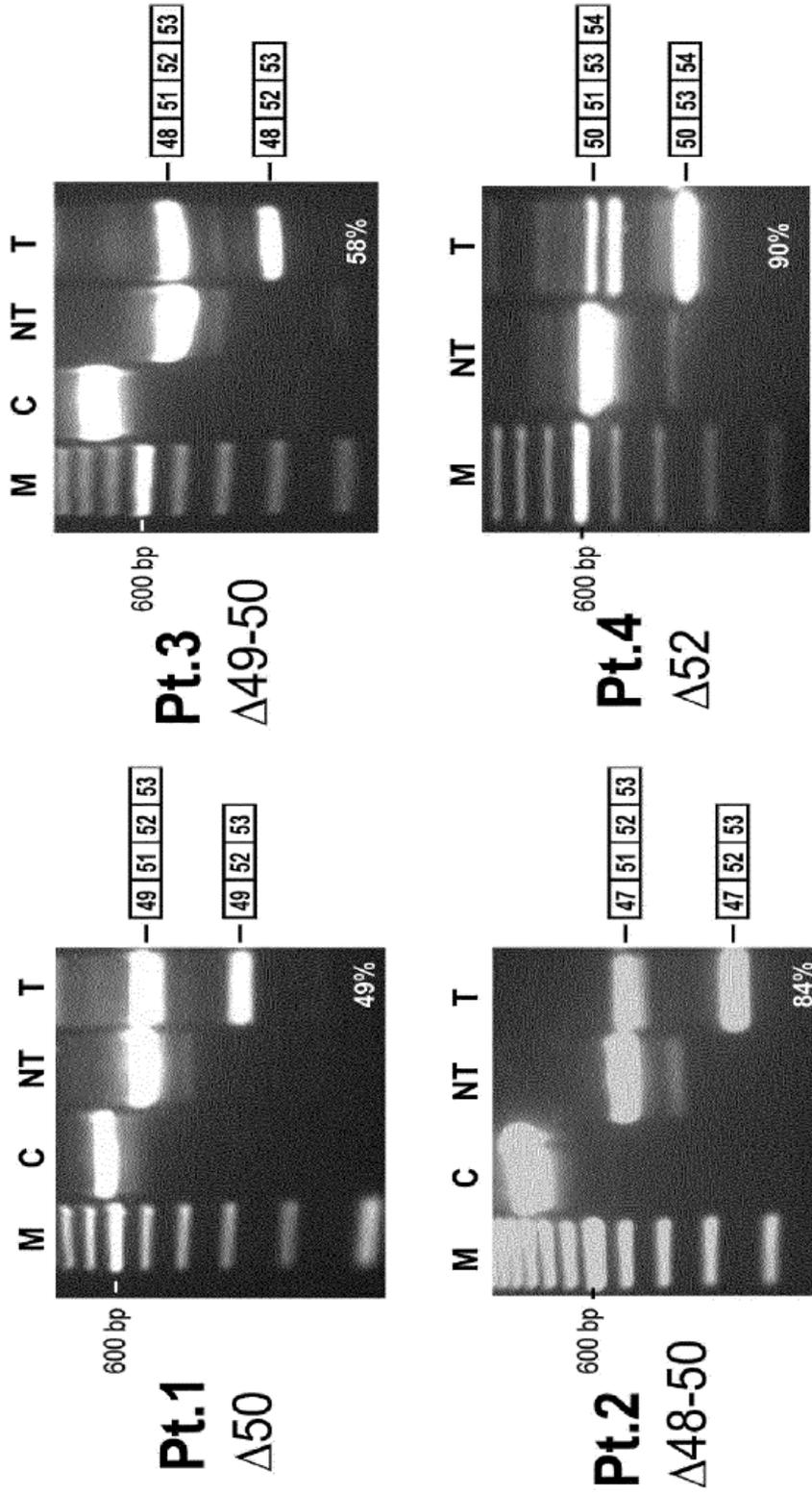


Fig 3c

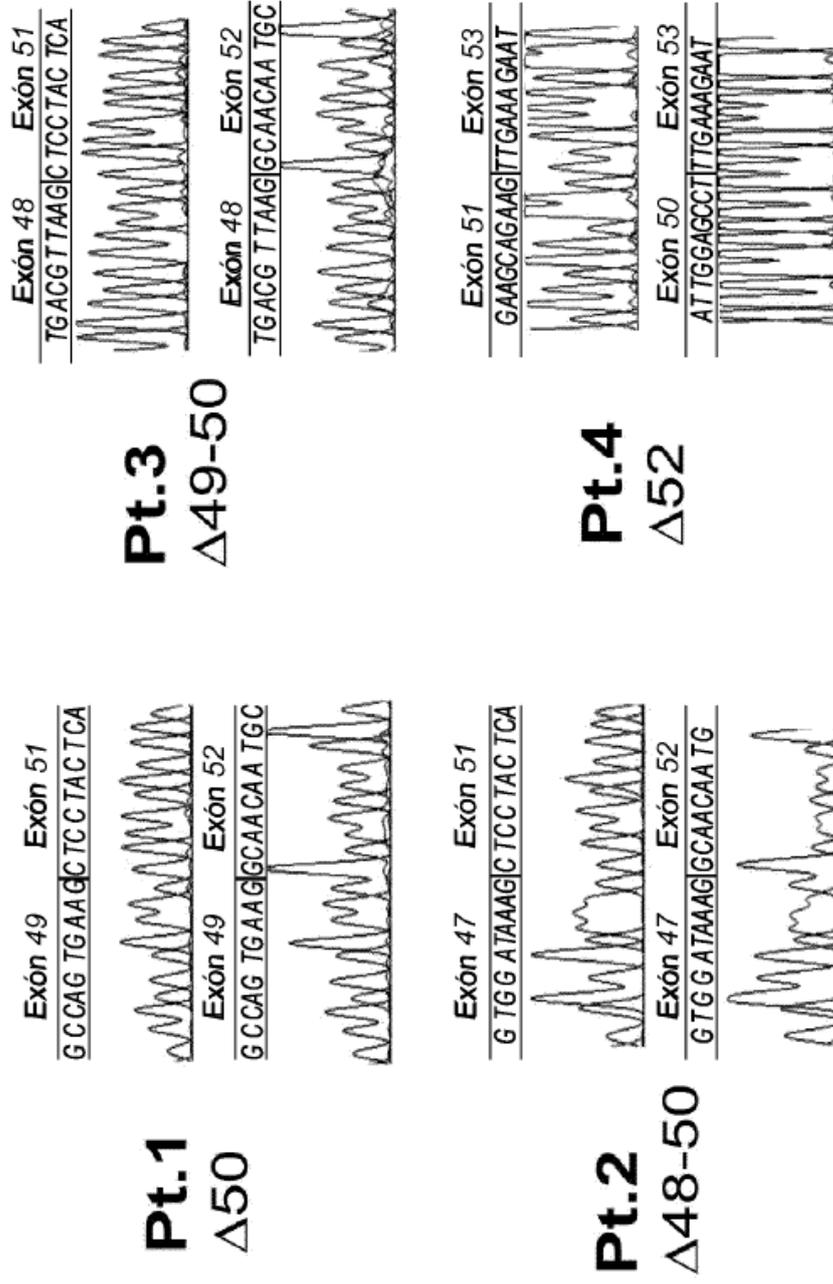
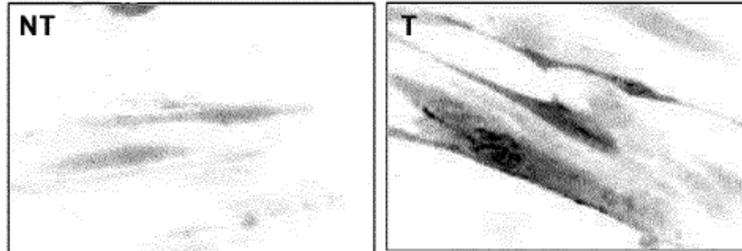
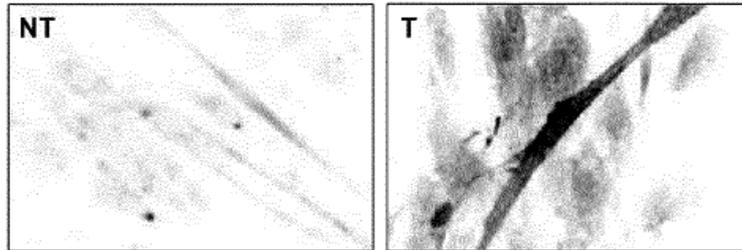


Fig 3d

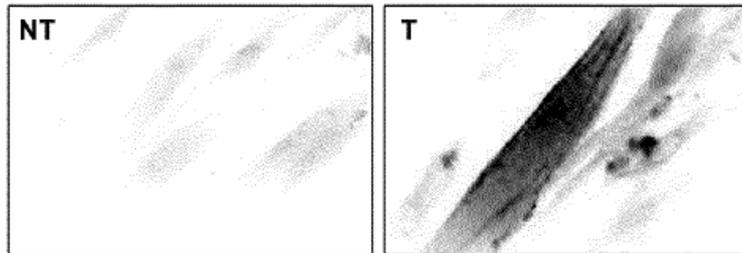
Pt.1
 $\Delta 50$



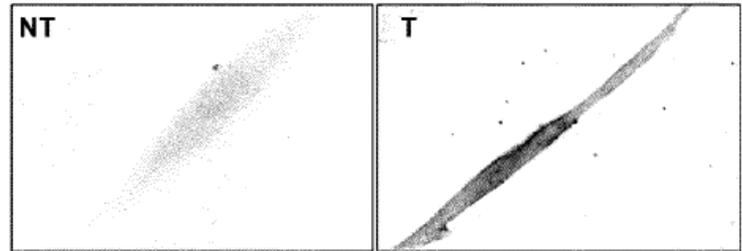
Pt.2
 $\Delta 48-50$



Pt.3
 $\Delta 49-50$



Pt.4
 $\Delta 52$



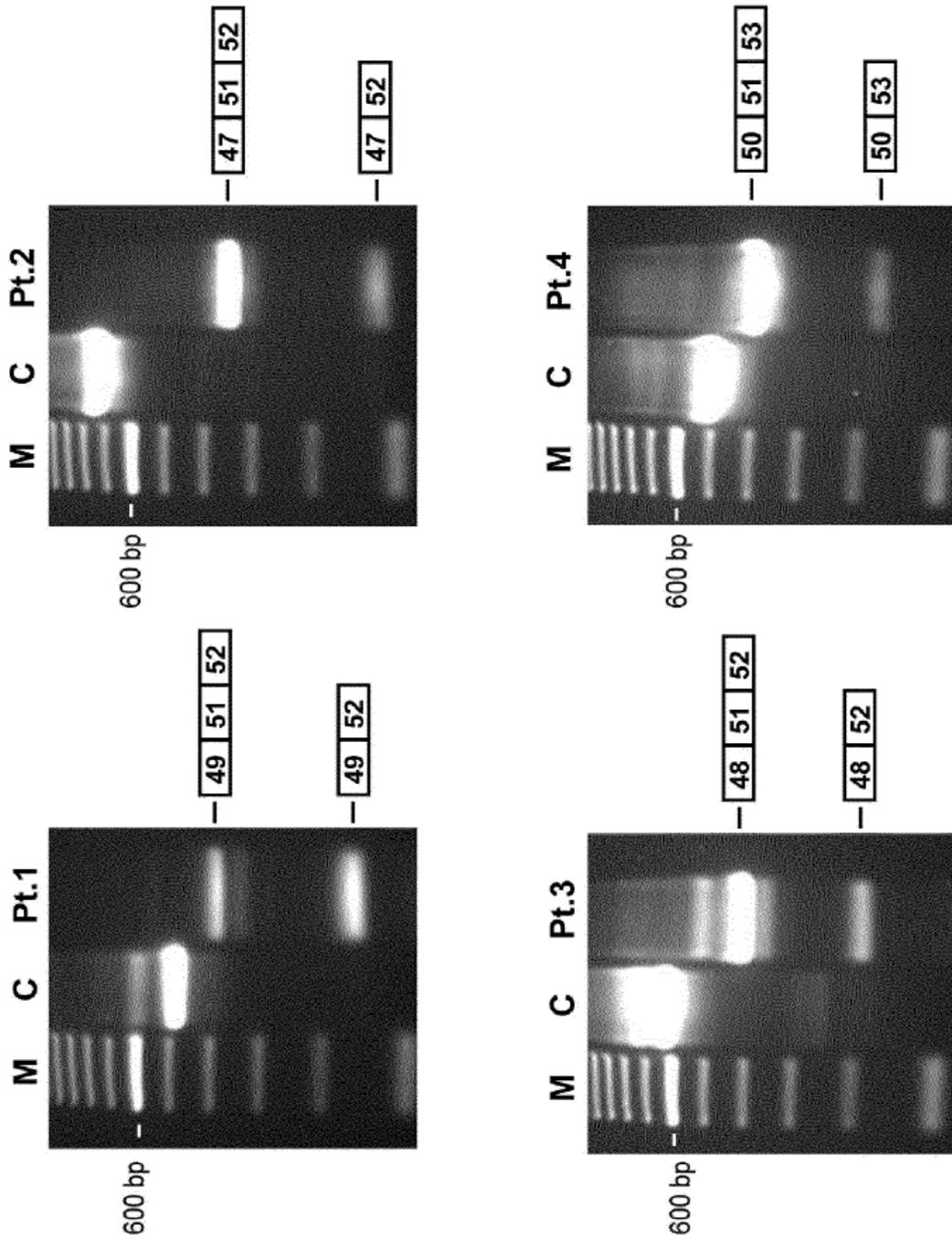


Fig 4a

Fig 4b

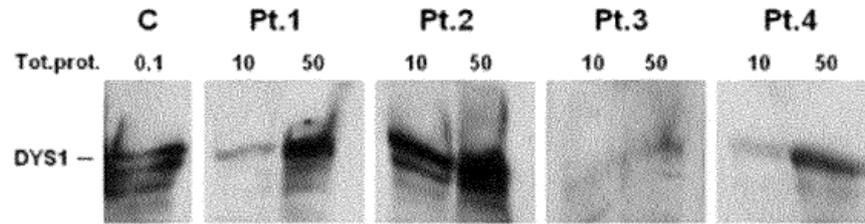


Fig 4c

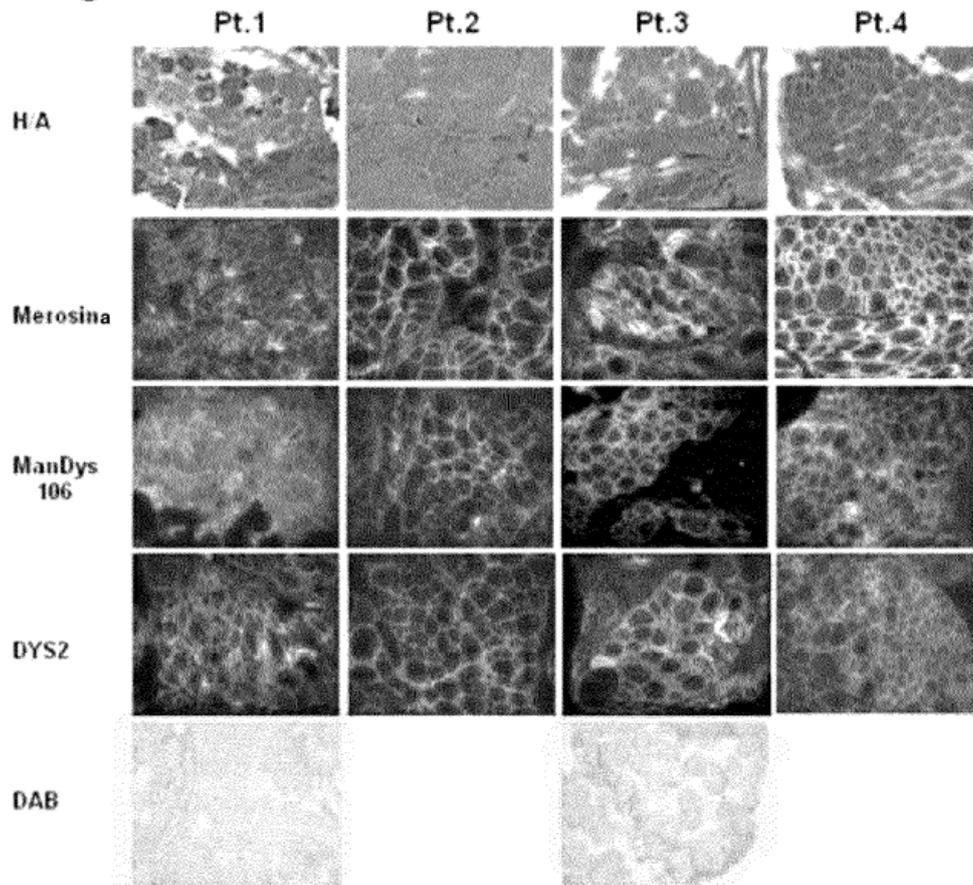


Fig 5

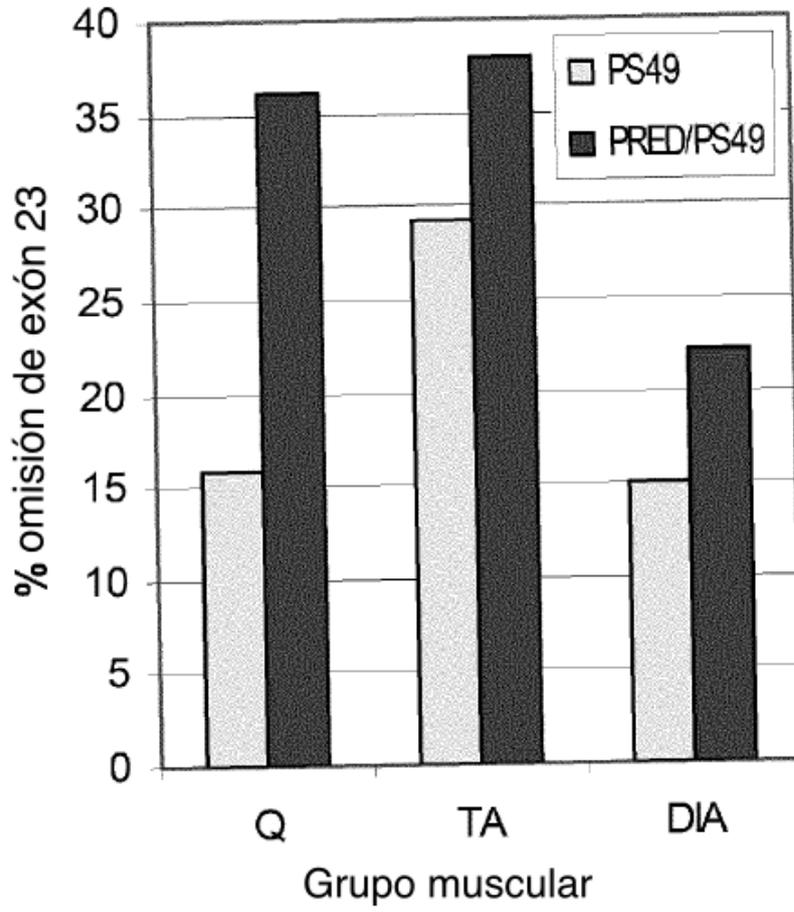


Fig 6a

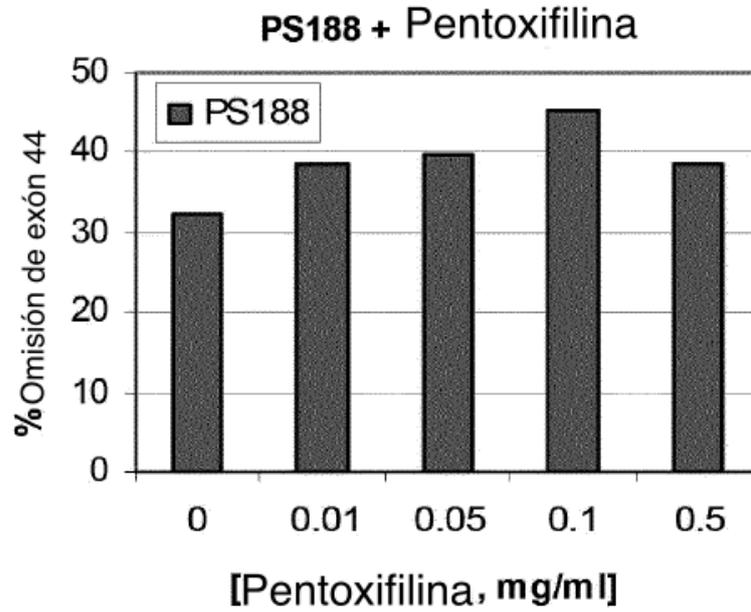


Fig 6b

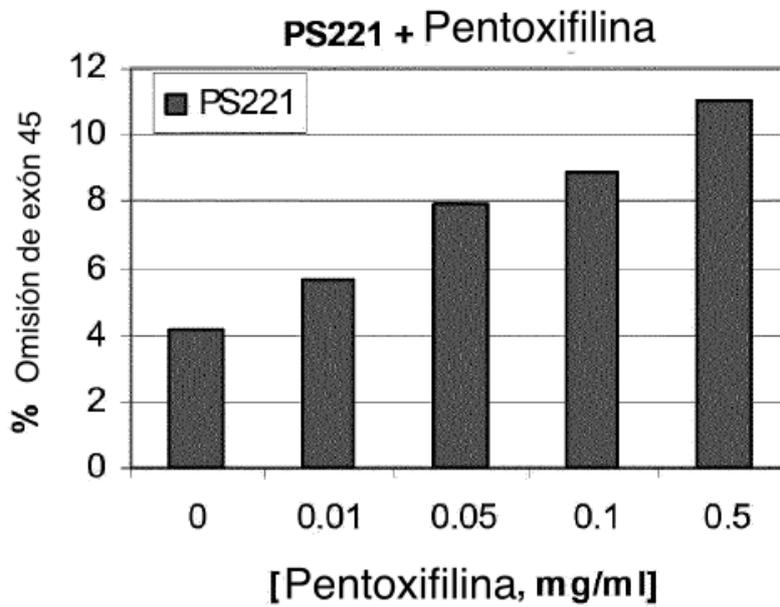


Fig 6c

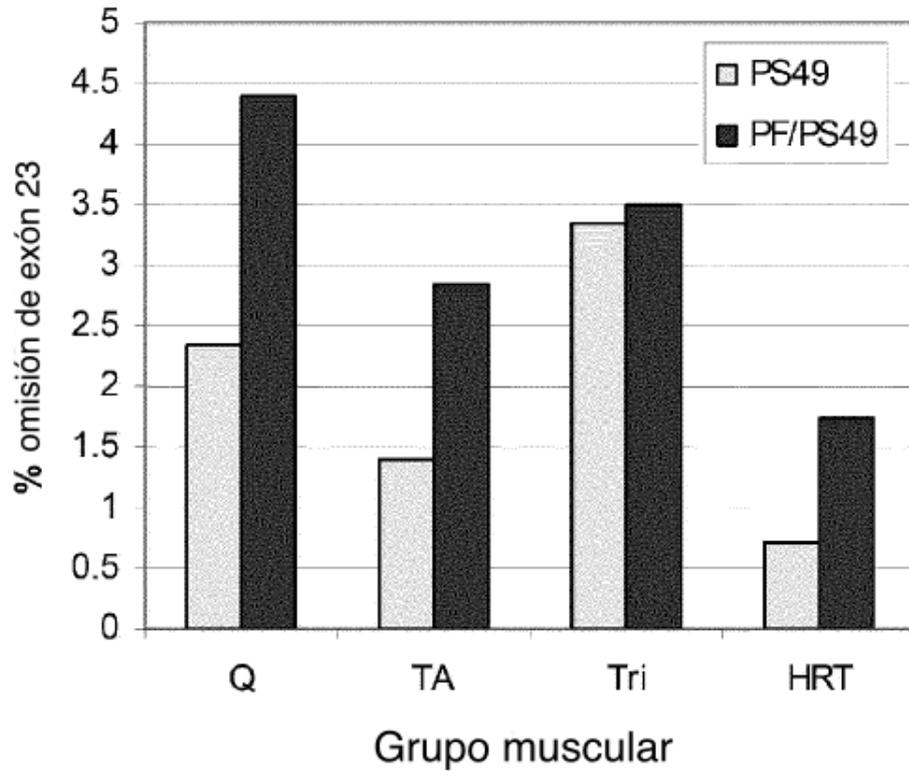


Fig 7

SEC ID N°1:

MLWVEEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDDLQDGRRLDLDLEGLTG
 QKLPKEKSTRVHALNNVNKALRVLQNNVLDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQ
 VKNVMKNIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRDL
 FDWNSVVCQQSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPDKKSILMYITSLFQVLPQQ
 VSIEAIQEVEMLRPPPKVTKEEHFQLHQMHSYQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQ
 AAYVTSDPTRSPFPSSQHLEAPEDKSGSSLMESEVNLDRYQTALIEEVLVSWLLSAEDTLQA
 QGEISNDVEVVKDQFHTHEGYMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLSSEDEETEVEEQM
 NLLNSRWECLEVASMEKQSNLHRVLMIDLQNKLKLNDWLTKTEERTKMEEEPLGPD
 EDLKRQVQHKVLEQEDLEQEQVRVNSLTHMVVVVDESSGDHATAALEEQKVLGDRWAN
 ICRWEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCLFSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSSLQK
 LAVLKADLEKQSMGKLYSLKQDLSLTKNKSVTQKTEAWLDNFARCWDLVQKLEKS
 TAQISQAVTTTQPSLTQTTVMETVTTVT .EQILVKHAQEELPPPPPQKKRQITVDSEIRKRL
 DVDITELHSWITRSEAVLQSPFAIFRKEGNFSDLKEKVNAIEREKA EKFRKLQDASRSAQA
 LVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNWLEYQNNIAFYNLQQLLEQMT
 TTAENWLKIQPTTPTSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLKIQSIALKEKGGPMLDA
 DFVAFTNHFKQVFSVDVQAREKELQTFIDTLPPMRYQETMSAIR1 WVQQSETKLSIPQLSVT
 DYEIMEQRLGELQALQSSLQEQQSGLYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQSEFEEIEGRWKK
 LSSQLVEHCQKLEEQMNLKRKIQNHQTLKKWMAEVDVFLKEEPALGDSEILKKQLKQC
 RLLVSDIQTIPSLNSVNEGQKIKNEAEPEFASRLETELKELNTQWDHMCQQVYARKEAL
 KGGLEKTVSLQKDLSEMHWEWMTQABEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQKE
 AKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETTLTNYQWLCRLNGKCKTLEEVWACWHEL
 LSYLEKANKWLNVEFKLKTENIPCGAEISEVLDLENLMRHSNDPNQIRILAQTLD
 GGVMDLINEELETFNRSRWRELHEEAVRRQKLEEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLA
 AYIADKVDAAMPQEAQKIQSDLSHEISLEEMKKNQGKEAAQRVLSQIDVAQKKLQDV
 SMKFRFLFQKPANFEQRLQESKMILDEVKMHLPALLETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKLSSE
 VKSEVEMVIKTGRQIVQKQKTENPKELDERVMTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKRS
 KMRKEMNVLTEWLAATDMELTKRSAVEGMPNSLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITE
 VGEALKTVLGGKETLVEDKLSLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFQDQNVDHITK
 WIIQADTLLEDESEKPKQKEDVLRKLAELNDRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRCRKL
 EPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKELEQFNSDIQKLEPLEAEIQGGVNLKEEDFNKD
 MNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEIKIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEIS
 HQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDERKIKEIDRELQKKKEELNAVRRQAEGL
 SEDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIHTVREETMMVMTEMDMPLEISYVP
 STYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFFKQEEESLKNIKDSLQSSGRIDIHSSKT
 AALQSATPVERVKLQEALSQDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSVEKWRRFHYDIKIFNQW
 LTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWLKELQDGIGQRQTVVRTLNATGEEHQSSKTDASIL
 QEKLGSLNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEADNIASIPLEPGK
 EQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGILKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKLGKQTNLQWI
 KVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKLEDEEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGPFD
 VQETEIAVQAKQPDVEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLLQELRAKQP
 DLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLS
 LLDQVIKSRVMVGDLNEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNKNKTSNQEART
 IITDRIERIQQWDEVEQEHLEQNRRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVVGQARAKLESWKE
 GPYTVDAIQKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVHMITENINAS
 WRSIHKRVSEREAALBETHRLLQFPLDLEKFLAWLTEAETTANVLQDATRKERLLEDKSG
 VKELMKQWQDLQGEIEAHTDVYHNLNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSL
 RKKSLNIRSHLEASSDQWKRLHLSLQELLVWLQKDDLSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHR
 AFKRELKTKPVMSTLETVRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRKQAEV
 NTEWEKLNLSADWQRKIDETLERLQELQEAATDELDELKLRQAEVIKGSWQVPGDILLISL

QDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVNDLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNRWKLQVAVE
 DRVRQLHEAHRDFGPASQHFLLSTSVQGPWERAISPKNVPYYINHETQTTTCWDHPKMTELY
 QSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDLLSLSAACDALDQHNLKQNDQPMDILQIINC
 LTTIYDRLEQEHNNLVNVPLCVDMCLNWLLNVYDTGRTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHLEDK
 YRYLFKQVASSTGFCDQRRLLGLLHDSIQIPRQLGEVASFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIE
 AALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVAAAETAKHQAKCNICKECPIIGFRYRSLKHFNYDICQ
 SCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKKNKFRTKRYFAKHPRMGYLPV
 QTVLEGDNMETPVTLINFWPVD SAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRLAEMENSNGSYLND
 ISPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPLSQPRSPAQILISLESEERGERILADLEENRNLQ
 AEYDRLKQQHEHKGLSPLSPPEMMPTSPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLEARMQILED
 HNKQLESQHLRLRQLLEQPQAEAKVNGT'TVSSPSTSLQRSDSSQPMLLRVVVGSQTSDSMGE
 EDLLSPPQDTSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

Fig 8

Secuencia de amino ácido de Isoforma 4 de IGF-1 humano.

SEC ID N° 2:

MGKISSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLFTTSSATAGPETLCGAELVDAL
 QFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRA
 QRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

Fig 9

Exón 43 de gen de DMD

SEC ID N° 3	CGACC UGAGC UUUGU UGUAG
SEC ID N° 4	CGACC UGAGC UUUGU UGUAG ACUAU
SEC ID N° 5	CCUGA GCUUU GUUGU AGACU AUC
SEC ID N° 6	CGUUG CACUU UGCAA UGCUG CUG
SEC ID N° 7	CUGUA GCUUC ACCCU UUCC
SEC ID N° 8	GAGAG AGCUU CCUGU AGCUU CACC
SEC ID N° 9	GUCCU UGUAC AUUUU GUUAA CUUUU UC
SEC ID N°263	GGA GAG AGC UUC CUG UAG CU
SEC ID N° 264	UCA CCC UUU CCA CAG GCG UUG CA
SEC ID N°265	UGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUG CUAU

Exón 44 de gen de DMD

SEC ID Nº 10	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID Nº 35	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID Nº 11	UUCAGCUUCUGUUAGCCACU	SEC ID Nº 36	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID Nº 12	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID Nº 37	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID Nº 13	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID Nº 38	AGCUUCUGUUAGCCACUGAU
SEC ID Nº 14	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID Nº 39	GCUUCUGUUAGCCACUGAUU
SEC ID Nº 15	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID Nº 40	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU
SEC ID Nº 16	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEC ID Nº 41	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUA
SEC ID Nº 17	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID Nº 42	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA
SEC ID Nº 18	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID Nº 43	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA
SEC ID Nº 19	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID Nº 44	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA
SEC ID Nº 20	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID Nº 45	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID Nº 21	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID Nº 46	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID Nº 22	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID Nº 47	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEC ID Nº 23	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID Nº 48	CCAUUUGUAUUUAGCAUGUUC
SEC ID Nº 24	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID Nº 49	AGAUACCAUUUGUAUUUAGC
SEC ID Nº 25	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID Nº 50	GCCAUUUCUCAACAGAUUCU
SEC ID Nº 26	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEC ID Nº 51	GCCAUUUCUCAACAGAUUCUGUCA

SEC ID Nº 27	CAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEC ID Nº 52	AUUCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC
SEC ID Nº 28	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEC ID Nº 53	UCUCAGGAAUUUGUGUCUUUC
SEC ID Nº 29	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID Nº 54	GUUCAUUCUGUUAGCC
SEC ID Nº 30	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEC ID Nº 55	CUGAUUAAAUAUCUUUAUUC
SEC ID Nº 31	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID Nº 56	GCCGCCAUUUCUCAACAG
SEC ID Nº 32	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEC ID Nº 57	GUAUUUAGCAUGUUC
SEC ID Nº 33	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID Nº 58	CAGGAAUUUGUGUCUUUC
SEC ID Nº 34	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEC ID Nº 267	UUU GUG UCU UUC UGA GAA AC
SEC ID Nº 266	UCAUAAUGAAAACGCCCAUUUCUCAACAG AUCU	SEC ID Nº 268	UUUAGCAUGUUCUCCAAUUCUCAGGA AUUG

ES 2 564 563 T3

Exón 45 de gen DMD

SEC ID N° 59	UUUGCCGCGCCCAAUGCCAUCUG	SEC ID N° 89	GUUGCAUUCAAUGUUCUGACAACAG
SEC ID N° 60	AUUCAAUGUUCUGACAACAGUUUGC	SEC ID N° 90	UUGCAUUCAAUGUUCUGACAACAGU
SEC ID N° 61	CCAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACAA	SEC ID N° 91	UGCAUUCAAUGUUCUGACAACAGUU
SEC ID N° 62	CAGUUGCAUUCAAUGUUCUGAC	SEC ID N° 92	GCAUUCAAUGUUCUGACAACAGUUU
SEC ID N° 63	AGUUGCAUUCAAUGUUCUGA	SEC ID N° 93	CAUUCAAUGUUCUGACAACAGUUUG
SEC ID N° 64	GAUUGCUGAAUUAUUUCUCC	SEC ID N° 94	AUUCAAUGUUCUGACAACAGUUUGC
SEC ID N° 65	GAUUGCUGAAUUAUUUCUCCCG	SEC ID N° 95	UCAUGUUCUGACAACAGUUUGCCG
SEC ID N° 66	AUUGCUGAAUUAUUUCUCCCGAGU	SEC ID N° 96	CAAUGUUCUGACAACAGUUUGCCGC
SEC ID N° 67	UUGCUGAAUUAUUUCUCCCGAGUU	SEC ID N° 97	AAUGUUCUGACAACAGUUUGCCGCU
SEC ID N° 68	UGCUGAAUUAUUUCUCCCGAGUUG	SEC ID N° 98	AUGUUCUGACAACAGUUUGCCGUG
SEC ID N° 69	GCUGAAUUAUUUCUCCCGAGUUGC	SEC ID N° 99	UGUUCUGACAACAGUUUGCCGUGC
SEC ID N° 70	CUGAAUUAUUUCUCCCGAGUUGCA	SEC ID N° 100	GUUCUGACAACAGUUUGCCGUGCC
SEC ID N° 71	UGAAUUAUUUCUCCCGAGUUGCAU	SEC ID N° 101	UUCUGACAACAGUUUGCCGUGCCC
SEC ID N° 72	GAAUUAUUUCUCCCGAGUUGCAUU	SEC ID N° 102	UCUGACAACAGUUUGCCGUGCCCA
SEC ID N° 73	AAUUAUUUCUCCCGAGUUGCAUUC	SEC ID N° 103	CUGACAACAGUUUGCCGUGCCCAA
SEC ID N° 74	AUUUAUUUCUCCCGAGUUGCAUUCA	SEC ID N° 104	UGACAACAGUUUGCCGUGCCCAAU
SEC ID N° 75	UUUAUUUCUCCCGAGUUGCAUUCAA	SEC ID N° 105	GACAACAGUUUGCCGUGCCCAAUG
SEC ID N° 76	UAUUUCUCCCGAGUUGCAUUCAAU	SEC ID N° 106	ACAACAGUUUGCCGUGCCCAAUGC
SEC ID N° 77	AUUUCUCCCGAGUUGCAUUCAAUG	SEC ID N° 107	CAACAGUUUGCCGUGCCCAAUGCC

SEC ID N° 78	UUUCUCCCGAGUUGCAUUCAAUGU	SEC ID N° 108	AACAGUUUGCCGUGCCCAAUGCCA
SEC ID N° 79	UUCUCCCGAGUUGCAUUCAAUGUU	SEC ID N° 109	ACAGUUUGCCGUGCCCAAUGCCAU
SEC ID N° 80	UCUCCCGAGUUGCAUUCAAUGUUC	SEC ID N° 110	CAGUUUGCCGUGCCCAAUGCCAUC
SEC ID N° 81	CUUCCCGAGUUGCAUUCAAUGUUCU	SEC ID N° 111	AGUUUGCCGUGCCCAAUGCCAUC
SEC ID N° 82	UUCCCAGUUGCAUUCAAUGUUCUG	SEC ID N° 112	GUUUGCCGUGCCCAAUGCCAUCU
SEC ID N° 83	UCCCGAGUUGCAUUCAAUGUUCUGA	SEC ID N° 113	UUUGCCGUGCCCAAUGCCAUCUG
SEC ID N° 84	CCCGAGUUGCAUUCAAUGUUCUGAC	SEC ID N° 114	UUGCCGUGCCCAAUGCCAUCUGG
SEC ID N° 85	CCCAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACA	SEC ID N° 115	UGCCGUGCCCAAUGCCAUCUGGA
SEC ID N° 86	CCAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACAA	SEC ID N° 116	GCCGUGCCCAAUGCCAUCUGGAG
SEC ID N° 87	CAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACAAC	SEC ID N° 117	CCGUGCCCAAUGCCAUCUGGAGU
SEC ID N° 88	AGUUGCAUUCAAUGUUCUGACAACA	SEC ID N° 118	CGUGCCCAAUGCCAUCUGGAGUU
SEC ID N° 269	UCC UGU AGA AUA CUG GCA UC	SEC ID N° 272	UGU UUU UGA GGA UUG CUG AA
SEC ID N° 270	UGC AGA CCU CCU GCC ACC GCA GAU UCA	SEC ID N° 273	UGUUCUGACAACAGUUUGCCGUGCCC AAUGCCAUCUGG
SEC ID N° 271	UUGCAGACCUCCUGCCACCGCAGAUUCAGGCU UC		

Exón 46 de gen de DMD

SEC ID N° 119	GCUUUUCUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 147	AGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUG
SEC ID N° 120	CUUUUCUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 148	GGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGU
SEC ID N° 121	UUUUUCUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 149	GUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 122	UUUCUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 150	UUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUA
SEC ID N° 123	UUCUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 151	UCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 124	UCUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 152	CAAGUGGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 125	CUUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 153	AAGUGGCAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 126	UUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 154	AGUGGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 127	UUUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 155	GUGGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 128	UUAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 156	UGGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 129	UAGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 157	GGGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 130	AGUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 158	GGAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 131	GUUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 159	GAUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 132	UUGCUGCUCUUU	SEC ID N° 160	AUACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 133	UGCUGCUCUUU	SEC ID N° 161	UACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 134	GCUGCUCUUU	SEC ID N° 162	ACUAGCAAUGUU
SEC ID N° 135	CUGCUCUUU	SEC ID N° 163	CUAGCAAUGUU
SEC ID N° 136	UGCUCUUU	SEC ID N° 164	UAGCAAUGUU

SEC ID N° 137	GCUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGAC	SEC ID N° 165	AGCAAUGUUAUCUGCUUCCUCCAAC
SEC ID N° 138	CUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGUA	SEC ID N° 166	GCAAUGUUAUCUGCUUCCUCCAACC
SEC ID N° 139	UCUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUAC	SEC ID N° 167	CAAUGUUAUCUGCUUCCUCCAACCA
SEC ID N° 140	CUUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACU	SEC ID N° 168	AAUGUUAUCUGCUUCCUCCAACCAU
SEC ID N° 141	UUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUA	SEC ID N° 169	AUGUUAUCUGCUUCCUCCAACCAUA
SEC ID N° 142	UUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAG	SEC ID N° 170	UGUUAUCUGCUUCCUCCAACCAUAA
SEC ID N° 143	UCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGC	SEC ID N° 171	GUUAUCUGCUUCCUCCAACCAUAAA
SEC ID N° 144	UCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCA	SEC ID N° 172	GCUGCUCUUUCCAGGUUC
SEC ID N° 145	CCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAA	SEC ID N° 173	UCUUUCCAGGUUCAAGUGG
SEC ID N° 146	CAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAU	SEC ID N° 174	AGGUUCAAGUGGGAUACUA
SEC ID N° 274	CUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUA GC	SEC ID N° 276	UAUUCUUUUGUUCUUCUAGCCUGGAGAA AG
SEC ID N° 275	CAAGCUUUUCUUUAGUUGCUGCUCUU UUC	SEC ID N° 277	CUGCUUCCUCCAACCAUAAAACAAAUUC

ES 2 564 563 T3

Exón 50 de gen de DMD

SEC ID Nº 175	CUCAGCUCUUGAAGUAAACG
SEC ID Nº 176	CCUCAGCUCUUGAAGUAAAC
SEC ID Nº 177	CCUCAGCUCUUGAAGUAAACG
SEC ID Nº 178	AUAGUGGUCAGUCCAGGAGCU
SEC ID Nº 179	CAGUC CAGGA GCUAG GUCAGG
SEC ID Nº 180	UAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUC
SEC ID Nº 278	CCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUAAACUUC
SEC ID Nº 279	CUUCCACUCAGAGCUCAGAUCUUCUAA
SEC ID Nº 280	CAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGC
SEC ID Nº 281	UCUUGAAGUAAACGGUUUACCGCCUCCACU CAGAGC

Exón 51 de gen de DMD

SEC ID Nº 181	AGAGCAGGUACCUCCAACAUCAAGG	SEC ID Nº 203	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUU
SEC ID Nº 182	GAGCAGGUACCUCCAACAUCAAGGA	SEC ID Nº 204	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCU
SEC ID Nº 183	AGCAGGUACCUCCAACAUCAAGGAA	SEC ID Nº 205	CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUG
SEC ID Nº 184	GCAGGUACCUCCAACAUCAAGGAAG	SEC ID Nº 206	AAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG
SEC ID Nº 185	CAGGUACCUCCAACAUCAAGGAAGA	SEC ID Nº 207	AGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGA
SEC ID Nº 186	AGGUACCUCCAACAUCAAGGAAGAU	SEC ID Nº 208	GGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAG
SEC ID Nº 187	GGUACCUCCAACAUCAAGGAAGAUG	SEC ID Nº 209	GAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGA
SEC ID Nº 188	GUACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGG	SEC ID Nº 210	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU
SEC ID Nº 189	UACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGC	SEC ID Nº 211	AGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG
SEC ID Nº 190	ACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCA	SEC ID Nº 212	GAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGG
SEC ID Nº 191	CCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAU	SEC ID Nº 213	AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGC
SEC ID Nº 192	CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	SEC ID Nº 214	UGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCA
SEC ID Nº 193	CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUU UCUAG	SEC ID Nº 215	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAG
SEC ID Nº 194	UCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUU	SEC ID Nº 216	GCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU
SEC ID Nº 195	CCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUC	SEC ID Nº 217	CAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUU
SEC ID Nº 196	CAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SEC ID Nº 218	AUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUU
SEC ID Nº 197	AACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUA	SEC ID Nº 219	UUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUC
SEC ID Nº 198	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	SEC ID Nº 220	UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCC

ES 2 564 563 T3

SEC ID Nº 199	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG UUUGG		
SEC ID Nº 200	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG		
SEC ID Nº 201	CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGU		
SEC ID Nº 202	AUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUU		

Exón 52 de gen de DMD

SEC ID Nº 221	CCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUU	SEC ID Nº 285	UUUUGGGCAGCGGUAUUGAGUUCUU
SEC ID Nº 222	CUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUC	SEC ID Nº 286	UUUGGGCAGCGGUAUUGAGUUCUUC
SEC ID Nº 223	UCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCA	SEC ID Nº 287	UUGGGCAGCGGUAUUGAGUUCUUCC
SEC ID Nº 224	CUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCA	SEC ID Nº 288	UGGGCAGCGGUAUUGAGUUCUCCA
SEC ID Nº 225	UUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAA	SEC ID Nº 289	GGGCAGCGGUAUUGAGUUCUCCAA
SEC ID Nº 226	UGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAU	SEC ID Nº 290	GGCAGCGGUAUUGAGUUCUCCAAC
SEC ID Nº 227	GAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUU	SEC ID Nº 291	GCAGCGGUAUUGAGUUCUCCAACU
SEC ID Nº 228	AUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUU	SEC ID Nº 292	CAGCGGUAUUGAGUUCUCCAACUG
SEC ID Nº 229	UUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUU	SEC ID Nº 293	AGCGGUAUUGAGUUCUCCAACUGG
SEC ID Nº 230	UGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUG	SEC ID Nº 294	GCGGUAUUGAGUUCUCCAACUGGG
SEC ID Nº 231	GCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGG	SEC ID Nº 295	CGGUAUUGAGUUCUCCAACUGGGG
SEC ID Nº 232	CUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGG	SEC ID Nº 296	GGUAUUGAGUUCUCCAACUGGGGA
SEC ID Nº 233	UGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGC	SEC ID Nº 297	GUAAUGAGUUCUCCAACUGGGGAC
SEC ID Nº 234	GGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCA	SEC ID Nº 298	UAAUGAGUUCUCCAACUGGGGACG
SEC ID Nº 235	GUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAG	SEC ID Nº 299	AAUGAGUUCUCCAACUGGGGACGC
SEC ID Nº 236	UCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAGC	SEC ID Nº 300	AUGAGUUCUCCAACUGGGGACGCC
SEC ID Nº 237	CUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAGCG	SEC ID Nº 301	UGAGUUCUCCAACUGGGGACGCCU
SEC ID Nº 238	UUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAGCGG	SEC ID Nº 302	GAGUUCUCCAACUGGGGACGCCUC

ES 2 564 563 T3

SEC ID Nº 239	UGUUUUUCAAUUUUUGGGCAGCGGU	SEC ID Nº 303	AGUUCUCCAACUGGGGACGCCUCU
SEC ID Nº 240	GUUUUUCAAUUUUUGGGCAGCGGUA	SEC ID Nº 304	GUUCUCCAACUGGGGACGCCUCUG
SEC ID Nº 241	UUUUUCAAAUUUUUGGGCAGCGGUA	SEC ID Nº 305	UUCUCCAACUGGGGACGCCUCUGU
SEC ID Nº 242	UUUUCAAAUUUUUGGGCAGCGGUAU	SEC ID Nº 306	UCUCCAACUGGGGACGCCUCUGUU
SEC ID Nº 243	UUUCAAAUUUUUGGGCAGCGGUAUG	SEC ID Nº 307	CUCCAACUGGGGACGCCUCUGUUC
SEC ID Nº 244	UUCAAAUUUUUGGGCAGCGGUAUGA	SEC ID Nº 308	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUCC
SEC ID Nº 245	UCAAAUUUUUGGGCAGCGGUAUGAG	SEC ID Nº 309	GAUUG CUGGU CUUGU UUUUC
SEC ID Nº 246	CAAAUUUUUGGGCAGCGGUAUGAGU	SEC ID Nº 310	CCUCU UGAUU GCUGG UCUUG
SEC ID Nº 247	AAUUUUUGGGCAGCGGUAUGAGUU	SEC ID Nº 311	GGUAA UGAGU UCUUC CAACU GG
SEC ID Nº 248	AAUUUUUGGGCAGCGGUAUGAGUUC	SEC ID Nº 312	ACUGG GGACG CCUCU GUUCC
SEC ID Nº 249	AUUUUUGGGCAGCGGUAUGAGUUCU	SEC ID Nº 283	ACUGGGGACGCCUCUGUCCA
SEC ID Nº 282	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUCC AAAUCC	SEC ID Nº 284	CCGUAAGAUUGUUCUAGCC

Exón 53 de gen de DMD

SEC ID Nº 250	CCAUGUGUUGAAUCCUUUAACAUI
SEC ID Nº 251	CCAUGUGUUGAAUCCUUUAAC
SEC ID Nº 252	AUUGUGUUGAAUCCUUUAAC
SEC ID Nº 253	CCUGUCCUAAGACCUGCUCA
SEC ID Nº 254	CUUUUGGAUUGCAUCUACUGUAUAG
SEC ID Nº 255	CAUUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUG
SEC ID Nº 256	CUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG
SEC ID Nº 257	CAUUCAACUGUUGCCUCCGGUUCUGAAGGUG
SEC ID Nº 258	CUGAAGGUGUUCUUGUACUUAUCC
SEC ID Nº 259	UGUAUAGGGACCCUCCUCCAUGACUC
SEC ID Nº 260	AUCCACUGAUUCUGAAUUC
SEC ID Nº 261	UUGGCUCUGGCCUGUCCUAAGA
SEC ID Nº 262	AAGACCUGCUCAGCUUCUCCUAGCUCCAG CCA