

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 578 993**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10768910 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2486136**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico y métodos para intercambiar uno o más exones mediante corte y empalme en trans**

30 Prioridad:

08.10.2009 US 249702 P

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

03.08.2016

73 Titular/es:

**ASSOCIATION INSTITUT DE MYOLOGIE (25.0%)
Bâtiment Babinski 47-83, Boulevard de l'Hôpital
75013 Paris, FR;
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (25.0%);
INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA
RECHERCHE MÉDICALE (25.0%) y
UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)
(25.0%)**

72 Inventor/es:

**GARCIA, LUIS y
LORAIN, STÉPHANIE**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 578 993 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

Moléculas de ácido nucleico y métodos para intercambiar uno o más exones mediante corte y empalme en trans

5 En la presente memoria se proporcionan métodos y composiciones para generar nuevas moléculas de ácidos nucleicos mediante corte y empalme en trans simple o doble mediado por empalmosoma diana ("targeted"). Entre dichas composiciones se incluyen moléculas pre-corte y empalme en trans (MPT, en la presente memoria también denominadas "molécula de CE" por "moléculas de corte y empalme en trans") diseñadas para interactuar con una molécula diana de ARN mensajero precursor (pre-ARNm diana) y para mediar en una reacción de corte y empalme en trans simple o doble que resulta en la generación de una nueva molécula de ARN recombinado ("chimeric") (ARN recombinado). Este enfoque permite sustituir secuencias completas de nucleótidos, tales como secuencias exónicas, en un ARNm diana y, por lo tanto, resultaría muy interesante tratar trastornos causados por mutaciones dominantes, conservando simultáneamente los niveles y la especificidad de tejidos. Esta estrategia de reparación del ARN resulta útil, de esta manera, para sustituir secuencias de ácidos nucleicos mutadas por las normales y tratar de esta manera muchos trastornos genéticos.

En particular, entre dichas MPT se incluyen las manipuladas genéticamente para interactuar con pre-ARNm diana de la DMD, de manera que resulta la corrección de los defectos genéticos de la DMD responsables de la distrofia muscular de Duchenne (DMD).

Entre dichas composiciones se incluyen además sistemas de vectores recombinantes capaces de expresar dichas MPT y células que expresan dichas MPT. Dichos métodos comprenden poner en contacto las MPT de interés con un pre-ARNm diana de la DMD bajo condiciones en las que una parte de la MPT se corta y empalma en trans con una parte del pre-ARNm diana para formar una molécula de ARNm en la que el defecto genético en el gen de la DMD ha sido corregido. Dichos métodos y composiciones pueden utilizarse en terapia génica para la corrección de trastornos neuromusculares tales como la distrofia muscular de Duchenne. El principio de este tratamiento también puede aplicarse a cualquier enfermedad genética en la que la mutación patógena implica una alteración del transcrito que puede corregirse mediante corte y empalme en trans simple o doble.

30 Antecedentes de la invención

Las secuencias de ADN en el cromosoma se transcriben en pre-ARNm que contienen regiones codificantes (exones) y que generalmente contienen además regiones no codificantes intermedias (intrones). Los intrones se eliminan de los pre-ARNm en un procedimiento preciso denominado corte y empalme en cis. El corte y empalme tiene lugar como interacción coordinada de varias partículas de ribonucleoproteína nucleares pequeñas (PRNnp) y muchos factores proteicos que se ensamblan formando un complejo enzimático conocido como empalmosoma (Staley y Guthrie, 1998).

En la mayoría de casos, la reacción de corte y empalme se produce dentro de la misma molécula de pre-ARNm, que se denomina corte y empalme en cis. El corte y empalme entre dos pre-ARNm transcritos independientemente se denomina corte y empalme en trans. El corte y empalme en trans fue identificado por primera vez en tripanosomas y posteriormente en nematodos, platelmintos y en mitocondrias vegetales, *Drosophila*, ratones y seres humanos (Takayuki Horiuchi y Toshiro Aigaki, 2006).

El mecanismo de corte y empalme en trans del líder de corte y empalme, que es prácticamente idéntico al corte y empalme en cis convencional, se produce mediante dos reacciones de transferencia de fosforilos. El primero provoca la formación de un enlace 2',5'-fosfodiéster, produciendo un intermediario ramificado en forma de 'Y', equivalente al intermediario en lazo en el corte y empalme en cis. La segunda reacción, ligación de exones, se produce tal como en el corte y empalme en cis convencional. Además, las secuencias en el sitio 3' de corte y empalme y algunos de los PRNnp que catalizan la reacción de corte y empalme en trans, son estrechamente similares a sus contrapartidas implicadas en el corte y empalme en cis.

El corte y empalme en trans también puede referirse a un procedimiento diferente, en el que un intrón de un pre-ARNm interactúa con un intrón de un segundo pre-ARNm, potenciando la recombinación de sitios de procesamiento entre dos pre-ARNm convencionales. Este tipo de corte y empalme en trans se planteó como explicación de los transcritos codificantes de una secuencia de región variable de inmunoglobulina humana unida a la región constante endógena en un ratón transgénico (Shimizu *et al.*, 1989). Además, se ha demostrado el corte y empalme en trans de pre-ARN cmyb (Vellard M. *et al.*, 1992) y más recientemente, se han detectado en células y extractos nucleares en cultivo transcritos de ARN de SV40 clonado cortados y empalmados en trans entre sí. Sin embargo, se cree que el corte y empalme en trans de los pre-ARNm de mamífero sólo se produce naturalmente en raras ocasiones (Finta C. *et al.*, 2002).

Varios autores han utilizado el corte y empalme en trans *in vitro* como sistema modelo para examinar el mecanismo de corte y empalme. Se ha conseguido un corte y empalme en trans razonablemente eficiente (30% de análogo cortado y empalmado en cis) entre los ARN que pueden presentar apareamiento de bases entre ellos, mientras que el corte y empalme de los ARN no anclados por apareamiento de bases se redujo adicionalmente en un factor de 10.

Otras reacciones de corte y empalme en trans *in vitro* que no requieren interacciones ARN-ARN evidentes entre los sustratos han sido observados por, por ejemplo, Chiara y Reed (Nature, 1995). Estas reacciones se producen a frecuencias relativamente bajas y requieren elementos especializados tales como un sitio 5' de corte y empalme cadena abajo o intensificadores exónicos de corte y empalme.

5 La presente invención se refiere a la utilización del corte y empalme en trans dirigido que está mediado por maquinaria de corte y empalme de mamífero natural, es decir, empalmosomas, para reprogramar o alterar la secuencia codificante de un ARNm diana.

10 Un gran número de estudios (ver, por ejemplo, Mansfield *et al.*, 2000; Puttaraju *et al.*, 2001) ya han descrito MPT que pueden mediar en el corte y empalme en trans "simple", es decir, una tecnología que permite sustituir la parte 3' de un transcrito o, más raramente, la parte 5' (Mansfield *et al.*, 2003; Kierlin-Duncan y Sullenger, 2007). Por ejemplo, las patentes US nº 6.083.702, nº 6.013.487 y nº 6.280.978 describen la utilización de MPT para mediar en una
15 reacción de corte y empalme en trans "simple" mediante la puesta en contacto de un ARNm precursor diana para generar nuevos ARN recombinados. Resulta importante que las tecnologías de corte y empalme en trans "simple" permiten corregir varias mutaciones utilizando minigenes o transcritos endógenos en el contexto de enfermedades genéticas como la hemofilia A (Chao *et al.*, 2003), la atrofia muscular espinal (Coady *et al.*, 2008), la inmunodeficiencia ligada al X (Tahara *et al.*, 2004) y la fibrosis quística, en las que la mutación extendida CFTR^{F508} es sustituida eficientemente *in vivo* por la secuencia normal mediante una reacción de corte y empalme en trans (Liu
20 *et al.*, 2005).

En contraste con el corte y empalme en trans "simple", el corte y empalme en trans "doble" permite sustituir o introducir una secuencia, tal como una secuencia exónica, en un ARNm diana (en la presente memoria denominadas ExChange: reacciones de corte y empalme en trans 3' y 5' concomitantes). Más exactamente, el corte
25 y empalme en trans doble puede modificar una secuencia exónica dada o sustituir una secuencia exónica faltante dentro de un transcrito de un gen dado, conservando simultáneamente las secuencias intrónicas reguladoras que se encuentran presentes en los lados 5' y 3' de la secuencia exónica que es diana del corte y empalme en trans doble, permitiendo de esta manera que se produzcan transcritos alternativos. A la inversa de la terapia génica convencional, los enfoques de corte y empalme en trans "doble" resultarían muy interesantes para tratar trastornos causados por mutaciones dominantes, conservando simultáneamente los niveles y la especificidad de tejidos. El
30 intercambio de exones (ExChange) utilizando el corte y empalme en trans doble, a ambos lados de un exón diana, presentaría la ventaja de minimizar el material exógeno, además de conservar todos los elementos reguladores potencialmente presentes en los dominios 5' y/o 3' no traducidos del ARNm rescatado. Como estrategia de reparación del ARN, el enfoque ExChange producirá la proteína corregida en donde se expresa naturalmente. Presenta la ventaja complementaria respecto a otras estrategias de cirugía del ADN de que corrige con precisión el defecto de la secuencia sin modificar nada de la secuencia de todo el mensajero (es decir, el marco de lectura abierto y las regiones no traducidas). Por lo tanto, las secuencias reguladoras presentes en las RNT 5' y 3' se conservan, algo que nunca ocurre en la terapia génica clásica, en la que se amputan los ADNc de sus secuencias no codificantes. Es conocido actualmente que dichas regiones resultan esenciales para la estabilidad del ARNm y la
40 regulación de la traducción; en particular, son dianas para los ARNip, los cuales ejercen una función importante en una diversidad de enfermedades (Zhang y Farwell, 2008).

Sin embargo, ningún estudio ha descrito anteriormente hasta el momento un MPT eficaz que permita llevar a cabo un corte y empalme en trans "doble", es decir un MPT que contenga tanto una región 3' de corte y empalme y una
45 región 5' de corte y empalme que deben insertarse en un ARNm diana. Además, ningún estudio ha demostrado que dicho MPT sea capaz de sustituir con elevada eficiencia una secuencia de nucleótidos dentro de un ARNm diana. Por ejemplo, dichas MPT sólo se conciben teóricamente en la solicitud publicada de patente US nº 2002/0193580 y en la solicitud de patente PCT WO 2004/050680.

50 Los resultados presentados en la presente memoria demuestran por primera vez una MPT eficiente que permite un elevado nivel de ExChange (es decir, reacciones concomitantes de corte y empalme en trans 3' y 5') y, por lo tanto, la posibilidad de rescatar transcritos mutados mediante la sustitución específica de un exón mutado por su versión normal durante una doble reacción de corte y empalme en trans. Mediante la utilización de la presente MPT, puede obtenerse una eficiencia de ExChange que alcanza un nivel de como mínimo aproximadamente 50%, por ejemplo de 53%, de transcritos reparados con el minigén DMD como diana. Resulta importante que no se hayan detectado en ningún caso unos productos finales no específicos, sugiriendo que las secuencias hibridantes seleccionadas de la MPT no descifraron el sitio de corte y empalme críptico ni obstruyeron sucesos de corte y empalme.

La tecnología de corte y empalme en trans utiliza una molécula de corte y empalme en trans que "engaña" al empalmosoma al utilizarlo como sustrato para el corte y empalme. En el enfoque ExChange, el juego resulta más
60 "complejo" ya que el empalmosoma debe realizar un corte y empalme en trans doble entre el transcrito premensajero y la MPT. Tras someter a ensayo diversas combinaciones de moléculas antisentido, los presentes inventores encontraron que los dogmas siguientes: i) bloqueo de señales endógenas de corte y empalme en el pre-transcrito de ARNm naciente mediante apareamiento de bases, o ii) por el contrario, llevar el exón sustituyente a una posición más próxima al sitio endógeno de corte y empalme que debe unirse, no producían resultados óptimos, tal como se muestra en los presentes ejemplos. En efecto, la mejor molécula antisentido para el primer corte y
65

empalme en trans (sustitución 3') se correspondía con la parte intermedia del primer intrón, mientras que la segunda (sustitución 5') funcionaba mejor al situarla en una posición próxima al extremo 3' del exón que debía sustituirse.

Leyendas de las figuras

5 La figura 1 expone la estrategia de corte y empalme en trans para la sustitución en 3':

10 (A) Exones 22 a 24 (cajas E22 a E24) con intrones naturales (las líneas con círculos negros ilustran los sitios de corte y empalme) en el minigén DMD. La cruz representa la mutación sin sentido *mdx* en E23. La molécula de corte y empalme en trans (CET) ASE24 comprende una secuencia antisentido (SA) de 150 nt complementaria al intrón 22, así como un espaciador, una secuencia de punto de ramificación de levadura conservada fuerte, un tramo polipirimidina, un sitio aceptor 3' (los tres últimos elementos se representan como círculos negros) y E24. Los constructos de CET se generaron con tres secuencias antisentido diferentes, AS1 a AS3. Las flechas indican las posiciones de los cebadores de PCR directo A e inverso B en el minigén y en la molécula de CET. (B) Transcritos esperados que se generaron mediante corte y empalme en cis (inclusión de E23 y salto) y corte y empalme en trans, y los tamaños predichos de los productos de amplificación por PCR correspondientes detectados utilizando la estrategia de RT-PCR ilustrada en (A). (C) Análisis de RT-PCR utilizando los cebadores de PCR A y B de células NIH3T3 cotransfectadas con minigén DMD y construcciones pSMD2-GFP (Ctrl), pSMD2-U7-SD23-BP22 (U7), pSMD2-E24 (AS-), pSMD2-AS1-E24 (AS1), pSMD2-AS2-E24 (AS2) y pSMD2-AS3-E24 (AS3). RT-AS2: muestras que contienen minigén DMD y pSMD2-AS2-E24 sin transcripción inversa; H₂O: control negativo de PCR. (D) Se confirmó una unión E22-E24 exacta mediante secuenciación del producto de 310 pb.

La figura 2 representa el enfoque de sustitución de exón en transcritos informadores de DMD.

25 (A) La molécula de intercambio de exón (EX) AS-E24-AS' comprende los mismos elementos que la molécula de CET (ver la figura 1A) seguido de un sitio donante 5' (círculos negros) y una segunda secuencia antisentido (AS') de 150 nt complementaria al intrón 23. Los constructos EX se generaron con cinco secuencias antisentido AS' diferentes, AS4 a AS8. Las flechas indican las posiciones de los cebadores de PCR directo A e inverso B en el minigén. (B) Transcritos esperados que se generaron mediante corte y empalme en cis (inclusión de E23 y salto) e intercambio de exón, y tamaños predichos de los productos de amplificación por PCR correspondientes detectados utilizando la estrategia de RT-PCR ilustrada en (A). (C) Análisis de RT-PCR utilizando los cebadores A y C de células NIH3T3 cotransfectadas con minigén DMD y construcciones pSMD2-GFP (Ctrl), pSMD2-U7-SD23-BP22 (U7), las construcciones de CET pSMD2-AS1-E24 (AS1), pSMD2-AS2-E24 (AS1) y la moléculas EX pSMD2-AS-E24-AS' que contenían AS1 o AS2 y AS4 a AS8. AS2-2XAS4, plásmido EX pSMD2-AS2-E24-2XAS4 que contenía dos copias de AS4; H₂O: control negativo de PCR. (D) Se confirmaron uniones exactas E22-E24 y E24-E24 mediante secuenciación del producto de 408 pb.

La figura 3 representa el efecto de las secuencias intrónicas intensificadoras de corte y empalme sobre la eficiencia de la sustitución de exón.

40 (A) Moléculas de intercambio de exón SA-E24-AS' con secuencias intrónicas intensificadoras de corte y empalme IICE o DISE. (B) Análisis de RT-PCR utilizando los cebadores A y C de células NIH3T3 cotransfectadas con minigén DMD y constructos pSMD2-GFP (Ctrl), pSMD2-U7-SD23-BP22 (U7) y los plásmidos EX siguientes con AS4 o AS8: pSMD2-AS2-E24-AS' (-), pSMD2-AS2-IICE-E24-AS' (ISE), pSMD2-AS2-E24-DISE-AS' (DISE) y pSMD2-AS2-E24-2XAS' (2XAS'). H₂O: control negativo de PCR. (C) Eficiencia de intercambio de exón de DMD inducido por moléculas EX que contienen SA4 analizadas mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativa absoluta.

La figura 4 representa la estrategia de corte y empalme en trans para la reparación del transcrito de distrofina con la molécula de corte y empalme en trans simple SEC ID nº 71 (Ejemplo 2)

50 El transcrito endógeno premensajero de distrofina se ilustra en la parte superior con cajas que representan exones y líneas negras que representan intrones. La molécula de ARNm de corte y empalme en trans (segunda línea) comprende una secuencia antisentido de 150 nt complementaria al intrón 58 del gen DMD, así como un espaciador, una secuencia de punto de ramificación (PR) de levadura conservado fuerte, un tramo polipirimidina (TPP), un aceptor 3' de corte y empalme (ACE) y el ADNc de distrofina humana normal entre el exón 59 y el codón de parada del exón 79.

La figura 5 muestra la detección de transcritos de distrofina reparados con la molécula de corte y empalme en trans simple SEC ID nº 71 (Ejemplo 2)

60 (A) El ARNm de distrofina mutado se representa en la parte superior, así como la molécula de ARNm de corte y empalme en trans SEC ID nº (segunda línea) y transcritos de distrofina esperados que se generaron mediante corte y empalme en cis y en trans (tercera línea). Las flechas indican las posiciones de los cebadores de PCR directos Fo/Fi e inversos Ro/Ri diseñados para detectar únicamente el ADNc de distrofina reparado mediante la generación de un producto de PCR de 2.443 pb. (B) Análisis de RT-PCR utilizando los cebadores de PCR Fo/Fi y Ro/Ri de ARN totales extraídos de miotubos de pacientes (DMD) transducidos por lentivirus que expresan las moléculas de ARNm

de corte y empalme en trans simple (MCET). Carril "-": miotubos de DMD no transducidos.

La figura 6 muestra el rescate de distrofina en células de DMD utilizando la molécula de corte y empalme en trans simple SEC ID nº 71 (Ejemplo 2).

5 Transferencia western de proteínas totales extraídas de miotubos de pacientes de DMD transducidos por lentivirus que expresan las moléculas de MCET, teñidas con el anticuerpo monoclonal NCL-DYS1. La distrofina de longitud completa de 427 kD se indica tal como se detecta en la muestra de miotubos de CHQ normales (WT). Carril "-":
10 miotubos de DMD no transducidos. Se cargó cada carril con 50 µg de proteínas totales excepto Ctrl, 5 µg. Panel rojo: visualización de las proteínas totales presentes en la misma membrana mediante tinción roja de Ponceau.

Sumario de la invención

15 La invención se refiere a una MPT que presenta las características del ácido nucleico según la reivindicación 1.

En un primer aspecto, la presente exposición se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende:

- 20 a) dos dominios de unión a diana AS y AS' que dianizan ("target") la unión de la molécula de ácido nucleico a un pre-ARNm diana, en el que los dos dominios de unión a diana AS y AS' se encuentran situados en el extremo 5' y en el extremo 3', respectivamente, de la molécula de ácido nucleico,
- b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme 3',
- 25 c) una región de corte y empalme 5' que comprende un sitio donante de corte y empalme 5',
- d) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana del extremo 5' AS,
- 30 e) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS', y
- f) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm diana, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte de un polipéptido normal y se encuentra situada
35 entre la región de corte y empalme 3' y la región de corte y empalme 5' de dicho ácido nucleico.

Dicha molécula de ácido nucleico en adelante se denomina "molécula de corte y empalme en trans doble" o "MPT doble".

40 Preferentemente, dicha molécula de ácido nucleico comprende:

- 45 a) dos dominios de unión a diana AS y AS' que dianizan la unión de la molécula de ácido nucleico a un pre-ARNm del gen de la distrofina (DMD), en el que los dos dominios de unión a diana AS y AS' se encuentran situados en el extremo 5' y en el extremo 3', respectivamente, de la molécula de ácido nucleico,
- b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme 3',
- 50 c) una región de corte y empalme 5' que comprende un sitio donante de corte y empalme 5',
- d) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana del extremo 5' AS,
- 55 e) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS', y
- f) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm del gen de la distrofina (DMD), en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte de un polipéptido distrofina normal y se encuentra situada entre la región de corte y empalme 3' y la región de corte y empalme 5' de dicho ácido nucleico.
60

En un segundo aspecto, la presente exposición se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende:

- 65 a) un dominio de unión a diana (AS) que dianiza la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm del gen de la distrofina (DMD),

- b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme 3',
- c) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana AS,
- d) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm diana, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte del polipéptido DMD.

Dicha molécula de ácido nucleico en adelante se denomina "molécula de corte y empalme en trans simple" o "MPT simple".

La presente invención se refiere además a un vector recombinante que comprende la MPT de la invención y a una célula que comprende las MPT de la invención, o el vector recombinante que comprende las MPT de la invención.

Las presentes composiciones y métodos pueden utilizarse para proporcionar un gen codificante de una molécula biológicamente activa funcional a células de un individuo con un trastorno genético heredado en el que la expresión del producto génico faltante o mutante produce un fenotipo normal.

Concretamente, las presentes composiciones y métodos pueden utilizarse para sustituir *in vitro* un exón endógeno mutado 23 o 70 del gen *DMD* dentro de una célula, comprendiendo poner en contacto el pre-ARNm celular del gen *DMD* con las MPT de la presente invención, bajo unas condiciones en las que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans se corta y empalma en trans con el pre-ARNm diana del gen *DMD* formando un ARNm recombinado dentro de la célula.

Adicionalmente, la presente invención da a conocer además un método para corregir *in vivo* un defecto genético de la *DMD* en un sujeto, comprendiendo administrar en dicho sujeto las MPT de la invención, o comprendiendo el vector las MPT de la invención, o comprendiendo la célula las MPT de la invención.

Más concretamente, la presente invención da a conocer un método para corregir por lo menos una mutación genética presente en el exón 23 o 70 del gen *DMD* en un sujeto que lo necesita, comprendiendo la administración en dicho sujeto de las MPT de la invención, en la que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans es por lo menos el exón 23 o por lo menos el exón 70 del gen *DMD*.

La presente exposición proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de las MPT de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

En un primer aspecto, la presente invención se basa en el diseño y la optimización de una MPT doble dedicada a reacciones concomitantes de corte y empalme en trans 3' y 5' con el fin de sustituir una secuencia de nucleótidos específica y por ejemplo un exón mutado, o de sustituir exones faltantes en el caso de mutaciones por delección. Por lo tanto, dicha MPT doble contiene necesariamente una región de corte y empalme 3' y una región de corte y empalme 5'. Además, la MPT doble debe contener por lo menos dos dominios diferentes de unión a diana que permiten que la MPT reconozca y se sitúe en una posición muy próxima al ARNm diana. Estos dos dominios de unión a diana se denominan "AS" (por antisentido).

En dicho primer aspecto, en la presente memoria se da a conocer una molécula de ácido nucleico que comprende:

- a) dos dominios de unión a diana AS y AS' que dianizan la unión de la molécula de ácido nucleico a un pre-ARNm diana, en el que los dos dominios de unión a diana AS y AS' se encuentran situados en el extremo 5' y en el extremo 3', respectivamente, de la molécula de ácido nucleico,
- b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme 3',
- c) una región de corte y empalme 5' que comprende un sitio donante de corte y empalme 5',
- d) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana del extremo 5' AS,
- e) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS', y
- f) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm diana, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte de un polipéptido normal y se encuentra situada entre la región de corte y empalme 3' y la región de corte y empalme 5' de dicho ácido nucleico.

Dicha molécula de ácido nucleico en adelante se denomina "molécula de corte y empalme en trans doble" o "MPT doble".

- 5 El dominio de unión a diana de una MPT dota a la MPT de una afinidad de unión para el pre-ARNm diana. Tal como se utiliza en la presente memoria, un dominio de unión a diana se define como cualquier molécula, es decir, nucleótido, proteína, compuesto químico, etc., que confiere especificidad de unión y ancla el pre-ARNm en una posición próxima a la MPT de manera que la maquinaria de procesamiento del empalmosoma del núcleo puede cortar y empalmar en trans de la MPT a una parte del pre-ARNm. Los dominios de unión a diana de la MPT preferentemente son secuencias de nucleótidos que son complementarios y en orientación antisentido respecto a la región diana del pre-ARNm diana seleccionado. Los dominios de unión a diana pueden comprender hasta varios miles de nucleótidos. En formas de realización preferentes, los dominios de unión a diana pueden comprender entre aproximadamente 100 y 200 nucleótidos, y preferentemente aproximadamente 150 nucleótidos.
- 10
- 15 Una secuencia "complementaria" a una parte de un ARN, tal como se denomina en la presente memoria, se refiere a una secuencia que presenta suficiente complementariedad para poder hibridarse con el pre-ARNm diana, formando un dúplex estable. La capacidad de hibridarse dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del ácido nucleico (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico hibridante, más desapareamientos de bases con un ARN puede contener y formar sin embargo un dúplex estable. El experto en la materia podrá determinar un grado tolerable de desapareamientos o una longitud de dúplex mediante la utilización de procedimientos estándares de determinación de la estabilidad del complejo hibridado. Los dominios de unión pueden comprender cualesquiera o todas las secuencias situadas dentro del intrón diana y exones flanqueantes y puede consistir de una secuencia contigua o contener huecos de secuencia de tamaño comprendido entre unos cuantos y varios cientos de nucleótidos de longitud. En dichos casos, el dominio de unión puede considerarse comprendido de múltiples dominios de unión más pequeños que se encuentra situados dentro de la MPT en cualquier orientación (sentido o antisentido) respecto a la secuencia diana o entre sí. Cualquiera o todos los elementos de secuencia dentro del dominio de unión pueden contener una complementariedad significativa respecto a la región diana.
- 20
- 25
- 30 Tras someter a ensayo diversas combinaciones de secuencias de nucleótidos antisentido, en el contexto de la presente invención se descubrió, al contrario de lo enseñado comúnmente en la técnica, que no resulta útil bloquear las señales endógenas de corte y empalme en el transcrito naciente de pre-ARNm mediante apareamiento de bases. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, los dominios de unión a diana de la MPT doble no bloquean las señales endógenas de corte y empalme en el transcrito naciente de pre-ARN.
- 35
- En una primera forma de realización, el pre-ARN diana es un exón mutado de un gen, y la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans con el pre-ARNm diana es el exón, o exones, normales correspondientes de dicho gen.
- 40
- El gen que es diana del corte y empalme en trans doble debe ser un gen que sea activamente transcrito en la célula que es diana del procedimiento. Debe estar compuesto por varios exones que se transcriben en una molécula de pre-ARNm.
- 45
- En este caso, se ha demostrado en la presente memoria por primera vez que situar el exón sustituyente en una posición más próxima al sitio endógeno de corte y empalme que debe unirse no produce los mejores resultados. Por lo tanto, los dominios de unión a diana AS y AS' preferentemente no son complementarios de las secuencias situadas próximas a los sitios endógenos de corte y empalme del exón mutado que debe sustituirse, es decir, a menos de 200 nucleótidos de los sitios endógenos de corte y empalme.
- 50
- La molécula de MPT doble contiene además una región de corte y empalme 3' que incluye una secuencia de punto de ramificación, un tramo polipirimidina (tal como SEC ID nº 28) y un sitio aceptor de corte y empalme 3'. La molécula de MPT doble contiene además una región de corte y empalme 5'.
- 55
- Las secuencias de consenso para el sitio donante de corte y empalme 5' y la región de corte y empalme 3' utilizadas en el corte y empalme del ARN son bien conocidas en la técnica (ver Moore *et al.*, The RNA World, Cold Spring Harbor Laboratory Press, páginas 303 a 358, 1993). Además, pueden utilizarse secuencias de consenso modificadas que mantienen la capacidad de funcionar como sitios donantes de corte y empalme 5' y regiones de corte y empalme 3'. Brevemente, las secuencias de consenso de mamífero para el sitio donante de corte y empalme 5' y el sitio aceptor de corte y empalme 3' son, respectivamente: GTAAGT y TCCCTCCAG. Por ejemplo, el sitio donante de corte y empalme 5' de la MPT doble puede ser GTAAGA (SEC ID nº 30) y el sitio aceptor de corte y empalme 3' de la MPT doble puede ser GGAAAACAG (SEC ID nº 29).
- 60
- La secuencia de consenso de punto de ramificación en mamíferos es YNYURAC (Y=pirimidina, N=cualquier nucleótido, R=purina). Por ejemplo, el punto de ramificación puede ser TACTAAC (SEC ID nº 25), correspondiente al punto de ramificación de levadura bien conservado (Mansfield *et al.*, 2000). La A es el sitio de formación de
- 65

ramificación. Un tramo polipirimidina se encuentra situado entre el punto de ramificación y el sitio aceptor de corte y empalme 3' y resulta importante para la utilización de diferentes puntos de ramificación y el reconocimiento del sitio de corte y empalme 3'. Recientemente se han identificado intrones de pre-ARNm que se inician con el dinucleótido AU y que finalizan con el dinucleótido AC y que se denominan intrones U12. Las secuencias de intrón U12 así como cualesquiera secuencias que funcionen como secuencias aceptoras/donantes de corte y empalme también pueden utilizarse para generar las MPT doble.

Una región espaciadora para separar el sitio de corte y empalme de ARN respecto del dominio de unión a diana también se encuentra incluida en la MPT doble. La MPT doble contiene por lo menos dos espaciadores diferentes: una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana AS y una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS'. Preferentemente son secuencias no codificantes y comprenden entre 10 y 100 nucleótidos, preferentemente entre 20 y 70 nucleótidos, más preferentemente entre 30 y 50 nucleótidos. Las regiones espaciadoras pueden diseñarse para incluir elementos tales como codones de parada que bloquearían cualquier traducción de una MPT cortada y empalmada. En una forma de realización, los intensificadores de corte y empalme, tales como, por ejemplo, secuencias denominadas intensificadores de corte y empalme exónicos, también pueden incluirse en el diseño de la MPT doble. Los factores de corte y empalme de acción en trans, es decir, las proteínas ricas en serina/arginina (SR), se ha demostrado que interactúan con dichos intensificadores de corte y empalme exónicos y modulan el corte y empalme (Tacke *et al.*, 1999). Además, el potenciador de corte y empalme intrónico rico en G del gen GH-1 humano (SEC ID nº 26) y/o la secuencia de DISE del gen FGFR2 de rata (SEC ID nº 27) pueden utilizarse como intensificadores de corte y empalme.

En una forma de realización más preferida, la secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana del extremo 5' AS contiene un IICE, por ejemplo el potenciador de corte y empalme intrónico rico en G del gen GH-1 humano (SEC ID nº 26) y la secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS contienen una secuencia DISE, por ejemplo la secuencia DISE del gen FGFR2 de rata (SEC ID nº 27), preferentemente muy próximo a la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans, es decir, la secuencia DISE debería encontrarse situada a una distancia no superior a 60 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans.

Pueden añadirse elementos adicionales a la molécula de MPT doble después, o antes, de la secuencia de nucleótidos codificante de una proteína traducible, tal como señales de poliadenilación para modificar la expresión/estabilidad del ARN, o secuencias de corte y empalme 5' para intensificar el corte y empalme, regiones de unión adicionales, regiones autocomplementarias "de seguridad", sitios de corte y empalme adicionales, o grupos protectores para modular la estabilidad de la molécula y evitar la degradación. Además, pueden incluirse codones de parada en la estructura de la MPT para evitar la traducción de las MPT no cortadas y empalmadas. Pueden incorporarse elementos adicionales, tales como una estructura de horquilla 3', ARN circularizado, modificaciones de bases nucleótidas, o análogos sintéticos en MPT dobles para fomentar o facilitar la localización nuclear y la incorporación empalmosómica, y la estabilidad intracelular.

A título de ejemplo, se dan a conocer el diseño y la optimización de los constructos Exchange (MPT), en el que dichos constructos Exchange están diseñados para rescatar los ARNm mutados de genes muy grandes, tales como el gen de la distrofina *DMD* (por ejemplo el gen *DMD* humano, identificado como NC_0000232.10, o el gen *DMD* de ratón, identificado como NC_000086.6). Las mutaciones en el gen de la distrofina *DMD* causan la distrofia muscular de Duchenne (*DMD*), la patología muscular grave más común en la infancia. Recientemente, las estrategias de salto de exón han demostrado eficacia en la restauración de la expresión funcional de la distrofina en modelos de distrofia muscular, incluyendo *mdx* de ratón, GRMD de perro y células madre musculares de pacientes de *DMD* y en cuatro pacientes de *DMD* mediante inyección intramuscular local (Goyenvalle *et al.*, 2004; Denti *et al.*, 2006; Yokota *et al.*, 2009). En efecto, la estructura modular de la distrofina, con su dominio en barra central constituido por 24 repeticiones similares a espectrina, tolera grandes truncados. Sin embargo, las estrategias de salto de exón sólo se refieren a pacientes en los que el corte y empalme forzado generaría una proteína más corta pero todavía funcional. Muchas situaciones patológicas no cumplen con dicho prerrequisito. En este contexto, las estrategias de ExChange resultarían de gran interés para sustituir con precisión un exón mutado de *DMD* por un exón correspondiente normal, y por ejemplo, el exón 23 mutado que porta una mutación de parada en el modelo de *mdx* de ratón de la *DMD* (ver la SEC ID nº 9) o una anomalía genética presente entre los exones 59 y 79, que representan el 8% de los pacientes de Duchenne. Además, las estrategias de ExChange podrían resultar útiles para sustituir exones ausentes, produciendo de esta manera un producto génico de longitud completa en lugar de un producto génico truncado como resultado de los enfoques de salto de exón.

Desde esta perspectiva, se demuestra en la presente memoria por primera vez que una MPT que permita un intercambio de exones eficiente (por ejemplo un exón del gen *DMD* y más particularmente el exón 23 del gen *DMD*) demostrando destacadamente que resulta posible el intercambio de un exón específico de manera eficiente utilizando la tecnología de corte y empalme en trans "doble".

En una forma de realización preferida, se da a conocer una molécula de ácido nucleico, que comprende:

- a) dos dominios de unión a diana AS y AS' que dianizan la unión de la molécula de ácido nucleico a un pre-ARNm del gen de la distrofina (DMD), en el que los dos dominios de unión a diana AS y AS' se encuentran situados en el extremo 5' y en el extremo 3', respectivamente, de la molécula de ácido nucleico,
- 5 b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme 3',
- c) una región de corte y empalme 5' que comprende un sitio donante de corte y empalme 5',
- 10 d) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana del extremo 5' AS,
- e) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS', y
- 15 f) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm del gen de la distrofina (DMD), en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte del polipéptido distrofina normal y se encuentra situada entre la región de corte y empalme 3' y la región de corte y empalme 5' de dicho ácido nucleico.

20 El diseño general, construcción e ingeniería genética de las MPT y la demostración de su capacidad de mediar en reacciones exitosas de corte y empalme en trans dentro de la célula se describen en detalle en las patentes US nº 6.083.706, nº 6.013.487 y nº 6.280.978, así como en las patentes nº de serie 09/941.492, nº 09/756.095, nº 09/756.096 y nº 09/756.097, cuyas exposiciones se incorporan como referencia en su totalidad en la presente memoria.

25 En una forma de realización particular, en la MPT doble de interés, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos un exón del gen *DMD* normal, preferentemente la secuencia del exón 23 del gen *DMD* normal, es decir, SEC ID nº 8 (del gen de ratón) o SEC ID nº 60 (del gen humano) o el gen 70 del gen *DMD* normal (SEC ID nº 72 para el gen humano, SEC ID nº 73 para el gen de ratón).

30 En una forma de realización preferida, el dominio de unión a diana del extremo 5' AS dirige la unión del ácido nucleico al intrón 22 del pre-ARNm del gen *DMD* (SEC ID nº 11 para el gen de ratón, o SEC ID nº 61 para el gen humano) y el dominio de unión a diana del extremo 3' AS' dirige la unión del ácido nucleico al intrón 23 del pre-ARN del gen *DMD* (SEC ID nº 12 para el gen de ratón, SEC ID nº 62 para el gen humano).

35 Preferentemente, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende:

- 40 a) dos dominios de unión a diana AS y AS' que dianizan la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm del gen de la distrofina (DMD), en el que los dos dominios de unión a diana AS y AS' se sitúan en el extremo 5' y en el extremo 3', respectivamente, de la molécula de ácido nucleico,
- b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme 3',
- 45 c) una región de corte y empalme 5' que comprende un sitio donante de corte y empalme 5',
- d) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana del extremo 5' AS,
- 50 e) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS', y
- 55 f) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm diana, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte de un polipéptido distrofina y se encuentra situada entre la región de corte y empalme 3' y la región de corte y empalme 5' de dicho ácido nucleico, y en la que:
 - el dominio de unión a diana del extremo 5' AS dirige la unión del ácido nucleico al intrón 22 del pre-ARNm del gen *DMD*, o
 - 60 - el dominio de unión a diana del extremo 5' AS comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre: SEC ID nº 13 y SEC ID nº 14, o
 - el dominio de unión a diana del extremo 3' AS' dirige la unión del ácido nucleico al intrón 23 del pre-ARN del gen *DMD*, o

- el dominio de unión a diana del extremo 5' AS dirige la unión del ácido nucleico al intrón 22 del pre-ARNm del gen DMD y el dominio de unión a diana del extremo 3' AS' dirige la unión del ácido nucleico al intrón 23 del pre-ARN del gen DMD, o

- 5
- el dominio de unión a diana del extremo 5' AS comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre: SEC ID nº 13 y SEC ID nº 14, el dominio de unión a diana del extremo 3' AS' dirige la unión del ácido nucleico al intrón 23 del pre-ARN del gen DMD.

10 En una forma de realización de la invención, los dominios de unión a diana AS y AS' comprenden entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 150 nucleótidos.

15 En una forma de realización preferida, el dominio de unión a diana del extremo 5' AS comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre: SEC ID nº 13 (en adelante denominada "AS1") y SEC ID nº 14 (en adelante denominada "AS2"). Preferentemente, el dominio de unión a diana del extremo 5' AS comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de SEC ID nº 15.

20 Por otra parte, el dominio de unión a diana del extremo 3' AS' dirige preferentemente la unión del ácido nucleico a una secuencia de nucleótido situada en la mitad 5' de la secuencia de nucleótidos del intrón 23, y, más preferentemente, a una secuencia de nucleótidos situada en SEC ID nº 22 (para el gen de ratón) y comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre: SEC ID nº 16 (en adelante denominada "AS4"), SEC ID nº 19 (en adelante denominada "AS7"), SEC ID nº 20 (en adelante denominada "AS8") y SEC ID nº 21 (en adelante denominada "2XAS4"). En una forma de realización preferente, el dominio de unión a diana del extremo 3' AS' comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de SEC ID nº 21.

25 En otra forma de realización, la MPT doble de la invención comprende una secuencia de punto de ramificación de levadura conservada, por ejemplo el punto de ramificación de levadura de SEC ID nº 25.

30 En otra forma de realización, el espaciador que separa el sitio donante de corte y empalme 5' y el dominio de unión a diana del extremo 3' AS' comprende entre 10 y 100 nucleótidos, preferentemente entre 20 y 70 nucleótidos, más preferentemente entre 30 y 50 nucleótidos. En una forma de realización preferente, dicho espaciador comprende un potenciador intrónico de corte y empalme posterior (DISE), que es preferentemente la secuencia de DISE del gen FGFR2 de rata, es decir, la SEC ID nº 27.

35 La secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' respecto del dominio de unión a diana del extremo 5' AS comprende entre 10 y 100 nucleótidos, preferentemente entre 20 y 70 nucleótidos, más preferentemente entre 30 y 50 nucleótidos.

40 Dichos espaciadores preferentemente son secuencias no codificantes aunque pueden diseñarse para incluir elementos tales como codones de parada que bloquearían cualquier traducción de una MPT cortada y empalmada. Se proporcionan ejemplos de espaciadores útiles en la parte experimental de la presente solicitud. Son, por ejemplo, la SEC ID nº 23 (extremo 3') y la SEC ID nº 24 (extremo 5').

45 En una forma de realización específica, la presente invención se refiere a un vector recombinante que comprende el ácido nucleico anteriormente indicado. Más particularmente, la MPT doble de interés puede manipularse recombinantemente en una diversidad de sistemas de vector huésped que también permiten la replicación del ADN a gran escala y contienen los elementos necesarios para dirigir la transcripción de la MPT doble. La utilización de dicho constructo para transfectar las células diana en el paciente resultará en la transcripción de cantidades suficientes de MPT doble que formarán pares de bases complementarios con las dianas de pre-ARNm expresado endógenamente, tal como, por ejemplo, la diana de pre-ARNm de DMD, facilitando de esta manera una reacción de corte y empalme in trans entre las moléculas de ácidos nucleicos acopladas. Dicho vector puede mantenerse en forma episómica o integrarse cromosómicamente, con la condición de que pueda transcribirse para producir el ARN deseado, es decir, la MPT. Dichos vectores pueden construirse mediante métodos de la tecnología del ADN recombinante que son estándares de la técnica. Los vectores que comprenden la MPT doble de interés pueden ser plasmídicos, víricos u otros conocidos de la técnica, que se utilizan para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de la MPT doble puede estar regulada por cualesquiera secuencias de promotor/intensificador conocidas de la técnica que actúan en células de mamífero, preferentemente humanas. Dichos promotores/intensificadores pueden ser inducibles o constitutivos. Dichos promotores incluyen de manera no limitativa: la región de promotor temprano del SV40, el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes, las secuencias reguladoras del gen metalotioneína, el promotor vírico del CMV, el promotor P de la gonadotropina coriónica humana, etc. Puede utilizarse cualquier tipo de vector plásmido, cósmido, YAC o virus para preparar el constructo de ADN recombinante que puede introducirse directamente en el sitio de tejido. Alternativamente, pueden utilizarse vectores víricos que infectan selectivamente la célula diana deseada. Entre los vectores para la utilización en la práctica de la invención se incluyen cualesquiera vectores de expresión eucarióticos, incluyendo de manera no limitativa, vectores de expresión vírica tales como los derivados de la clase de los retrovirus, adenovirus o virus adenoasociados.

60

65

En una forma de realización preferida, el vector recombinante de la invención es un vector de expresión eucariótico.

En otra forma de realización específica, la MPT doble de la invención se administra en una célula diana. Se conocen diversos sistemas de administración que pueden utilizarse para transferir las composiciones de las invención al interior de las células, por ejemplo el encapsulado en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la composición, endocitosis mediada por receptores, la construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado u otro vector, la inyección del ADN, la electroporación, la transfección mediada por fosfato de calcio, etc. En este caso, la MPT que puede ser utilizada en cualquier forma por el experto en la materia, por ejemplo una molécula de ARN, o un vector de ADN que se transcribe en una molécula de ARN, en el que dicha MPT se une a un pre-ARNm y media en la reacción de corte y empalme en trans doble, resultando en la formación de un ARN recombinado que comprende una parte de la molécula de MPT cortada y empalmada con una parte del pre-ARNm. La presente invención se refiere además a una célula que comprende la MPT doble de la invención o un vector recombinante que comprende la MPT doble de la invención.

En una forma de realización preferida, la célula que comprende la MPT doble o el vector recombinante que comprende la MPT doble es una célula eucariótica.

Las composiciones y métodos pueden utilizarse para proporcionar un gen codificante de una molécula biológicamente activa funcional a células de un individuo con un trastorno genético hereditario en el que la expresión del producto génico faltante o mutante produce un fenotipo normal.

Concretamente, las presentes composiciones y métodos pueden utilizarse para sustituir *in vitro* un exón endógeno mutado del gen *DMD* dentro de una célula, comprendiendo poner en contacto el pre-ARNm celular del gen *DMD* con las MPT dobles de la presente invención, bajo condiciones en las que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans se corta y empalma en trans con el pre-ARNm diana del gen *DMD* formando un ARNm recombinado dentro de la célula. Dicho exón mutado preferentemente es el exón 23 del gen *DMD*.

Adicionalmente, la presente invención da a conocer además un método para corregir *in vivo* un defecto genético de la *DMD* en un sujeto, comprendiendo administrar en dicho sujeto las MPT dobles de la invención, o un vector que comprende la MPT dobles de la invención, o la célula que comprende la MPT dobles de la invención.

Más concretamente, la presente invención da a conocer un método para corregir por lo menos una mutación genética presente en por lo menos un exón mutado endógeno del gen *DMD* en un sujeto que lo necesita, comprendiendo administrar en dicho sujeto la MPT doble de la invención.

Preferentemente, dicho exón mutado endógeno es el exón 23 del gen *DMD*, o el exón 70 del gen *DMD*, y la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos el exón 23 del gen *DMD* (SEC ID nº 8 para el gen de ratón, SEC ID nº 60 para el gen humano) o por lo menos el exón 70 del gen *DMD* (SEC ID nº 72 para el gen de ratón, SEC ID nº 73 para el gen humano).

En otras palabras, la presente invención da a conocer una MPT doble, un vector que la comprende, o una célula que la comprende, para la utilización de las mismas en la corrección de un defecto genético de la *DMD* en un sujeto que lo necesita, o más exactamente, para la utilización de las mismas en la corrección de por lo menos una mutación genética presente en por lo menos uno de los genes *DMD* en un sujeto que lo necesita, en el que, preferentemente dicho exón mutado endógeno es el exón 23 del gen *DMD* o el exón 70 del gen *DMD*, y la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos el exón 23 del gen *DMD* (SEC ID nº 8 para el gen de ratón; SEC ID nº 60 para el gen humano) o por lo menos el exón 70 del gen *DMD* (SEC ID nº 72 para el gen de ratón; SEC ID nº 73 para el gen humano).

La presente exposición proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de las MPT doble de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o presentada en la U.S. Pharmacopeia u otra farmacopea generalmente reconocida para la utilización en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portadores" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el terapéutico. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin.

Se da a conocer además un método para tratar la distrofia muscular de Duchenne en un sujeto que lo necesita, comprendiendo dicho método la administración en dicho sujeto de la composición farmacéutica que comprende la MPT doble de interés. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos un exón del gen *DMD*, por ejemplo el exón 23 del gen *DMD* (SEC ID nº 8 o SEC ID nº 60) o el exón 70 del gen *DMD* (SEC ID nº 72 o SEC ID nº 73). En otras palabras, la presente invención cubre la MPT doble de la invención para la utilización de la misma en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne en un sujeto que lo necesita. Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans es por lo menos un exón del gen *DMD*, por ejemplo el exón 23 del gen *DMD* (SEC ID nº 8 o SEC ID nº 60) o el exón 70

del gen *DMD* (SEC ID nº 72 o SEC ID nº 73).

En una forma de realización específica, puede resultar deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente en el área que requiere tratamiento, es decir, en los músculos. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, aunque de modo no limitativo, infusión local durante cirugía, infusión locorregional bajo presión en una extremidad en la que el flujo sanguíneo arterial y venoso se interrumpe intermitentemente con un torniquete, aplicación tópica, etc., conjuntamente con un vendaje sobre la herida tras la cirugía, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Existen otros sistemas de administración de fármaco de liberación controlada, tales como nanopartículas, matrices tales como polímeros de liberación controlada e hidrogeles. La MPT doble se administra en cantidades que resultan eficaces para producir el efecto deseado en la célula diana. Las dosis eficaces de las MPT dobles pueden determinarse mediante procedimientos bien conocidos de la técnica que se refieren a parámetros tales como la semivida biológica, la biodisponibilidad y la toxicidad. La cantidad de la composición que resultará eficaz dependerá de la gravedad de la *DMD* bajo tratamiento y podrá ser determinada mediante técnicas clínicas estándares.

La MPT doble también puede administrarse en células o células madre *ex vivo* que pueden, en una segunda etapa después de la corrección *ex vivo*, transferirse en forma de trasplante celular a un individuo con el objetivo de corregir un órgano o un individuo afectado por una enfermedad genética mediante terapia celular.

En un segundo aspecto, la presente exposición se refiere a una molécula de ácido nucleico destinada al corte y empalme en trans simple tal como se describe en los ejemplos siguientes.

En la presente forma de realización particular, la molécula de ácido nucleico comprende:

- a) un dominio de unión a diana (AS) que dianiza la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm del gen de la distrofina (*DMD*),
- b) una región de corte y empalme 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme 3',
- c) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana AS,
- d) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm diana, en el que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte del polipéptido *DMD*.

Dicha molécula de ácido nucleico en adelante se denomina "molécula de corte y empalme en trans simple" o "MPT simple".

Las diferentes partes de dicha molécula de corte y empalme en trans simple (sitio aceptor de corte y empalme 3', punto de ramificación, tramo polipirimidina, secuencia espaciadora) son iguales a las indicadas anteriormente para la MPT que media en el corte y empalme en trans doble, es decir, por ejemplo, SEC ID nº 29 para el sitio aceptor de corte y empalme 3', SEC ID nº 25 para el punto de ramificación, SEC ID nº 28 para el tramo polipirimidina y SEC ID nº 23 para el espaciador del extremo 3'.

De hecho, la presente exposición también muestra en la presente memoria por primera vez una MPT simple que permite la sustitución eficiente de uno o más exones (por ejemplo la sustitución del exón 70 anormal del gen *DMD* humano por el normal), demostrando de manera destacada que la sustitución del exón o exones específicos resulta posible y eficiente también con una tecnología de corte y empalme en trans "simple" (ver el Ejemplo 2).

En dicha MPT simple, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans con el pre-ARNm del gen de la distrofina (*DMD*) comprende preferentemente uno o varios exones del gen *DMD* normal, más preferentemente el exón 23 o cualquiera de los exones 59 a 79 del gen *DMD*. Todavía más preferentemente, la secuencia que debe cortarse y empalmarse en trans es el exón 70 del gen *DMD*, o el ADNc de todos los exones 59 a 79 del gen *DMD*, tal como se muestra en el Ejemplo 2, a continuación.

Más exactamente, en la MPT simple, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans es la secuencia del exón 23 del gen *DMD* normal (es decir, SEC ID nº 8 para el gen de ratón o SEC ID nº 60 para el gen humano), o la secuencia del exón 70 del gen *DMD* (es decir, SEC ID nº 72 para el gen humano, y SEC ID nº 73 para el gen de ratón) o el ADNc correspondiente a los exones 59 a 79 del gen *DMD* (es decir, SEC ID nº 69 para el gen de ratón o SEC ID nº 70 para el gen humano).

En una forma de realización preferida, el dominio de unión a diana del extremo 5' AS de las MPT simples dirige la unión del ácido nucleico al intrón 22 del pre-ARNm del gen *DMD* (SEC ID nº 11 para el gen de ratón, o SEC ID nº 61 para el gen humano), o al intrón 58 del pre-ARN del gen *DMD* (SEC ID nº 66 para el gen de ratón, SEC ID nº 67 para el gen humano).

En una forma de realización más preferida, el dominio de unión a diana del extremo 5' AS de la MPT simple presenta la secuencia SEC ID nº 68 (para dirigir la MPT al intrón 58 del gen *DMD*) o SEC ID nº 13, SEC ID nº 14, SEC ID nº 15 o SEC ID nº 58 (para dirigir la MPT al intrón 22 del gen *DMD*).

En una forma de realización todavía más preferida, la molécula de corte y empalme en trans simple presenta la SEC ID nº 71.

En una forma de realización específica, la presente exposición se refiere a un vector recombinante que comprende la MPT simple mencionada anteriormente. Más particularmente, la MPT simple de interés puede manipularse de manera recombinante en una diversidad de sistemas de vector huésped que también permiten la replicación del ADN a gran escala y contienen los elementos necesarios para dirigir la transcripción de la MPT simple. La utilización de dicho constructo para transfectar las células diana en el paciente resultará en la transcripción de cantidades suficientes de MPT simples que formarán pares de bases complementarios con las dianas de pre-ARNm expresadas endógenamente, tal como, por ejemplo, la diana de pre-ARNm de *DMD*, facilitando de esta manera una reacción de corte y empalme en trans entre las moléculas de ácidos nucleicos acomplejadas. Dicho vector puede mantenerse en forma episómica o integrarse cromosómicamente, con la condición de que pueda transcribirse para producir el ARN deseado, es decir, la MPT. Dichos vectores pueden construirse mediante métodos de la tecnología del ADN recombinante que son estándares de la técnica. Los vectores que comprenden la MPT simple de interés pueden ser plasmídicos, víricos u otros conocidos de la técnica, que se utilizan para la replicación y expresión en células de mamífero. La expresión de la MPT simple puede estar regulada por cualesquiera secuencias de promotor/intensificador conocidas de la técnica que actúan en células de mamífero, preferentemente humanas. Dichos promotores/intensificadores pueden ser inducibles o constitutivos. Entre dichos promotores se incluyen, aunque sin limitarse a ellos: la región de promotor temprano del SV40, el promotor contenido en la repetición terminal larga 3' del virus del sarcoma de Rous, el promotor de la timidina quinasa del virus del herpes, las secuencias reguladoras del gen metalotioneína, el promotor vírico del CMV, el promotor P de la gonadotropina coriónica humana, etc. Puede utilizarse cualquier tipo de vector plásmido, cósmido, YAC o virus para preparar el constructo de ADN recombinante que puede introducirse directamente en el sitio de tejido. Alternativamente, pueden utilizarse vectores víricos que infectan selectivamente la célula diana deseada. Entre los vectores para la utilización en la práctica de la exposición se incluyen cualesquiera vectores de expresión eucarióticos, incluyendo de manera no limitativa, vectores de expresión vírica tales como los derivados de la clase de los retrovirus, adenovirus o virus adenoasociados.

En una forma de realización preferida, el vector recombinante de la exposición es un vector de expresión eucariótico.

En otra forma de realización específica, la presente exposición comprende administrar la presente MPT simple en una célula diana. Se conocen diversos sistemas de administración que pueden utilizarse para transferir las composiciones al interior de las células, por ejemplo el encapsulado en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la composición, endocitosis mediada por receptores, la construcción de un ácido nucleico como parte de un retrovirus, adenovirus, virus adenoasociado u otro vector, la inyección del ADN, la electroporación, la transfección mediada por fosfato de calcio, etc. En este caso, la MPT simple que puede ser utilizada en cualquier forma por el experto en la materia, por ejemplo una molécula de ARN, o un vector de ADN que se transcribe en una molécula de ARN, en el que dicha MPT se une a un pre-ARNm y media en la reacción de corte y empalme en trans simple, resultando en la formación de un ARN recombinado que comprende una parte de la molécula de MPT simple cortada y empalmada con una parte del pre-ARNm. La presente exposición se refiere además a una célula que comprende la MPT simple de interés, o el vector recombinante que comprende la MPT simple de interés.

En una forma de realización preferida, la célula que comprende la MPT simple o el vector recombinante que comprende la MPT simple es una célula eucariótica.

Dicha MPT simple aparentemente es una herramienta muy interesante con diana en pacientes de *DMD* independientemente de su mutación de *DMD*. Al permitir restaurar los exones mutados del gen *DMD*, dicha molécula aparentemente también es una herramienta eficiente para tratar los pacientes de *DMD*.

Por lo tanto, la presente exposición se refiere además a un método de tratamiento de un paciente que sufre distrofia muscular de Duchenne, que comprende administrar en dicho paciente una composición farmacéutica que comprende dicha molécula de corte y empalme en trans simple o el vector recombinante que comprende la misma, o la célula que las comprende. Es decir, la presente exposición se refiere a la presente molécula de corte y empalme en trans o el vector recombinante que comprende la misma, o la célula que las comprende, para la utilización en una composición farmacéutica para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne en un sujeto que lo necesita.

Más exactamente, la presente exposición se refiere además a un método para corregir un defecto genético de *DMD* en un sujeto, que comprende administrar en dicho sujeto dicha molécula de corte y empalme en trans simple, o el vector recombinante que comprende la misma, o la célula que las comprende. En otras palabras, la presente exposición se refiere a la presente molécula de corte y empalme en trans simple o el vector recombinante que

comprende la misma, o la célula que las comprende, para la utilización en la corrección de un defecto genético de la DMD en un sujeto que lo necesita.

Preferentemente, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos un exón del gen *DMD* y comprende más preferentemente por lo menos el exón 23 del gen *DMD* normal (es decir, SEC ID nº 8 para el gen de ratón, o SEC ID nº 60 para el gen humano) o el gen 70 del gen *DMD* (es decir, SEC ID nº 72 para el gen humano, o SEC ID nº 73 para el gen murino) o cualquier exón seleccionado de entre los exones 59 a 79 del gen *DMD*. En una forma de realización preferente, comprende el ADNc de los exones 59 a 79 del gen *DMD* (es decir, SEC ID nº 70 para el gen humano y SEC ID nº 69 para el gen de ratón).

La presente exposición se refiere además a un método *in vitro* para sustituir *in vitro* un exón endógeno mutado del gen *DMD* dentro de una célula, comprendiendo poner en contacto el pre-ARNm celular del gen *DMD* con dicha molécula de corte y empalme en trans simple, bajo condiciones en las que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans se corta y empalma en trans con el pre-ARNm diana del gen *DMD* formando un ARNm recombinado dentro de la célula. Preferentemente, dicho exón mutado es el exón 23 del gen *DMD*, o el exón 70 del gen *DMD* o cualquier exón seleccionado de entre los exones 59 a 79 del gen *DMD*. Más preferentemente, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans con el pre-ARNm diana del gen *DMD* comprende, de esta manera, por lo menos el exón 23 o el exón 70 del gen *DMD*, o cualquier exón seleccionado de entre los exones 59 a 79 del gen *DMD*. Todavía más preferentemente, la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans con el pre-ARNm diana del gen *DMD* comprende el ADNc de los exones 59 a 79 del gen *DMD* humano.

La presente exposición se refiere además a un método para corregir por lo menos una mutación genética presente en por lo menos un exón del gen *DMD* en un sujeto que lo necesita, comprendiendo administrar en dicho sujeto dicha molécula de corte y empalme en trans simple. Preferentemente, dicho exón o exones del gen *DMD* es el exón 23 o el exón 70, y la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos el exón 23 del gen *DMD* (es decir, SEC ID nº 8 para el gen de ratón, o SEC ID nº 60 para el gen humano) o el gen 70 del gen *DMD* (es decir, SEC ID nº 72 para el gen humano, o SEC ID nº 73 para el gen murino) o el ADNc entre los exones 59 y 79 del gen *DMD* humano normal (SEC ID nº 70).

En dicho caso, en otras palabras, la exposición se refiere a la molécula de corte y empalme en trans simple, o al vector recombinante que comprende la misma, o a la célula que las comprende, para la utilización de los mismos en la corrección de por lo menos una mutación genética presente en el exón 23 o en el exón 70 del gen *DMD* humano normal en un sujeto que lo necesita, en el que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos el exón 23 del gen *DMD* normal (es decir SEC ID nº 8 para el gen de ratón o SEC ID nº 60 para el gen humano) o el exón 70 del gen *DMD* normal (es decir, SEC ID nº 72 para el gen humano, o SEC ID nº 73 para el gen de ratón) o el ADNc entre los exones 59 y 79 del gen *DMD* humano normal (SEC ID nº 70).

La presente exposición proporciona además unas composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de las MPC simple y un portador farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a autorizado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o listada en la Farmacopea US u otra farmacopea generalmente reconocida para la utilización en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el terapéutico. Se describen ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences", de E.W. Martin.

En una forma de realización específica, puede resultar deseable administrar las composiciones farmacéuticas localmente en el área que requiere tratamiento, es decir, en los músculos. Esto puede llevarse a cabo mediante, por ejemplo, aunque de modo no limitativo, infusión local durante cirugía, infusión locorregional bajo presión en una extremidad en la que el flujo sanguíneo arterial y venoso se interrumpe intermitentemente con un torniquete, aplicación tópica, etc., conjuntamente con un vendaje sobre la herida tras la cirugía, mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio, o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. Existen otros sistemas de administración de fármaco de liberación controlada, tales como nanopartículas, matrices tales como polímeros de liberación controlada e hidrogeles. La MPT simple se administra en cantidades que resultan eficaces para producir el efecto deseado en la célula diana. Las dosis eficaces de las MPT simples pueden determinarse mediante procedimientos bien conocidos de la técnica que se refieren a parámetros tales como la semivida biológica, la biodisponibilidad y la toxicidad. La cantidad de la composición de la invención que resultará eficaz dependerá de la gravedad de la DMD bajo tratamiento y podrá ser determinada mediante técnicas clínicas estándares.

La MPT simple también puede administrarse en células o células madre *ex vivo* que pueden, en una segunda etapa después de la corrección *ex vivo*, transferirse en forma de trasplante celular a un individuo con el objetivo de corregir un órgano o un individuo afectado por una enfermedad genética mediante terapia celular.

Ejemplos

1. Molécula de corte y empalme en trans doble

5 1.1. Materiales y métodos

Construcciones de plásmido

10 Se construyó el minigén DMD murino diana (3.993 pb (SEC ID nº 39)) que comprendía los exones E22, E23 y E24 y las secuencias intrónicas flanqueantes E23 naturales se construyeron mediante amplificación por PCR a partir de ADN genómico *mdx* y se subclonaron en pSMD2 en el sitio KpnI. Se introdujo un ATG en el contexto Kozak ACCACCATGG y un codón de parada en ambos lados del minigén.

15 La E24 para las moléculas de CET y EX (114 pb (SEC ID nº 10)) se amplificó a partir del minigén DMD. Los diferentes dominios de las moléculas de CET y EX detalladas en la sección de Resultados se construyeron mediante PCR y se subclonaron en pSMD2 en HindIII y EcoRI entre el promotor del CMV y la señal poliA. Las secuencias antisentido AS se unen a DMD intrón 22: AS1 presenta como diana los nucleótidos -763 a -614 (SEC ID nº 13); AS2, -463 a -314 (SEC ID nº 14); AS3 -159 a -10 (SEC ID nº 15); AS3bis -159 a +5 (SEC ID nº 58) (en la que el nucleótido +1 es el primer nucleótido de E23). El segundo dominio antisentido AS' se une a DMD intrón 23: AS4, +1801 a +1950 (SEC ID nº 16); AS5, +2101 a +2250 (SEC ID nº 17); AS6, +2401 a +2550 (SEC ID nº 18); AS7, -5 a +145 (SEC ID nº 19); AS8, +151 a +300 (SEC ID nº 20) (en las que el nucleótido +1 es el primer nucleótido del intrón 23).

20 Todos los casetes de expresión se encuentran bajo el control del promotor fuerte del CMV y una señal poliA y se verificaron mediante secuenciación.

25

Cultivo celular y transfección

30 Se mantuvieron células fibroblásticas NIH3T3 embrionarias de ratón en DMEM (Invitrogen) complementadas con SFB inactivado por calor al 10% (Invitrogen), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Para las transfecciones, las células se cultivaron hasta el 70% de confluencia en placas de 12 pocillos y se expusieron al complejo reactivo de ADN/lipofectamina 2000 (Invitrogen) durante 5 h en DMEM antes de devolverlas al medio de cultivo normal. Típicamente se utilizaron 0,5 µg de minigén DMD y 1,5 µg de moléculas de ADN de CET o EX en cada transfección. Las células se analizaron rutinariamente 72 h después de la transfección.

35 Análisis de RT-PCR

40 Se aisló el ARN total a partir de las células transfectadas mediante la utilización del minikit RNeasy (Qiagen). Se llevó a cabo la transcripción inversa en 200 ng de ARN mediante la utilización de Superscript II (Invitrogen) y el cebador inverso pSMD2-R1 (ver posteriormente) a 10 minutos a 25°C, 50 minutos a 42°C y una etapa final de 5 minutos a 95°C. Para detectar los transcritos de DMD no reparados y reparados, el ARN transcrito inversamente se amplificó por PCR bajo las condiciones siguientes: 95°C durante 5 minutos, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 minuto a 56°C, 45 s a 1 minuto a 72°C, y una etapa final de 7 minutos a 72°C.

45 Las secuencias de los cebadores eran las siguientes: E22-F GACACTTTACCACCAATGCGC (SEC ID nº 36) (cebador A en las figs. 1A-B y 2A-B), pSMD2-R1 CTTTCTGATAGGCAGCCTGC (SEC ID nº 37) (cebador B en la fig. 1A-B) y pSMD2-R5 cTcAcctGAAGTTcTcAGG (SEC ID nº 38) (cebador C en la fig. 2A-B). Se separaron los productos de RT-PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio y se secuenciaron.

50 RT-PCR en tiempo real cuantitativa

55 Se midieron los niveles de ARNm mediante el método de RT-PCR en tiempo real cuantitativa absoluta utilizando la mezcla Absolute SYBR Green Rox (Thermo Scientific). Se clonaron dos fragmentos de ADNc de DMD de control positivo, E22-E23-E24 y E22-E24-E24, en pCR@2.1-TOPO@. Como muestras de referencias, dichos plásmidos se diluyeron en serie 10 veces (entre 10^7 y 10^3 copias) y se utilizaron para generar curvas estándares. Se llevó a cabo una PCR en tiempo real y se analizó en un DNA Engine Opticon 2 (Bio-Rad). En cada experimento, se amplificaron con cebadores específicos duplicados de series de dilución estándar de plásmidos de control y ADNc de primera cadena generado con Superscript II (Invitrogen) a partir de 200 ng de ARN total. Se utilizaron los cebadores para E23, E23-F AGATGGCCAAGAAAGCACC (SEC ID nº 32) y E23-R CTTTCCACCAACTGGGAGG (SEC ID nº 33) para medir el transcrito de DMD no reparado, y los cebadores para la unión E24-E24, E24-F TGAAAAACAGCTCAAACAATGC (SEC ID nº 34) y E24-R AGCATCCCCCAGGGCAGGC (SEC ID nº 35), para el transcrito reparado.

60

1. 2. Resultados

Diseño de moléculas de corte y empalme en trans (moléculas de TS)

5 En moléculas ExChange, el exón sustituyente se encuentra flanqueado por secuencias intrónicas artificiales con sitios de corte y empalme aceptores y donantes fuertes, las cuales se encuentran conectadas con secuencias antisentido diseñadas para hibridarse con el ARNm diana. La hibridación resulta crucial para permitir la reacción de corte y empalme en trans, aunque por sí sola no resulta suficiente. Idealmente, el sitio de hibridación debe alterar la definición del exón diana en el pre-mensajero parental, potenciando simultáneamente el corte y empalme cruzado
10 entre los dos ARNm independientes. En el caso de ExChange, existen más restricciones, ya que deben sincronizarse dos reacciones de corte y empalme en trans en ambos límites del exón diana.

El modelo murino de DMD, el ratón *mdx*, porta una mutación sin sentido en el exón 23 (E23^m: SEC ID nº 9) del gen de la distrofina. Con el fin de localizar el mejor sitio de hibridación en el intrón 22, cadena arriba del exón mutado, se diseñaron tres moléculas de corte y empalme en trans (CET) para la sustitución 3' que únicamente diferían en los dominios de unión de las mismas (fig. 1A). Se seleccionaron secuencias antisentido de aproximadamente 150 nucleótidos (AS1=SEC ID nº 13, AS2=SEC ID nº 14 y AS3=SEC ID nº 15) para que fueran correspondientes con el extremo 5', la parte intermedia o el extremo 3' del intrón 22 (SEC ID nº 11). La idea era someter a ensayo si la situación de la molécula de CET próxima a su diana, el sitio donante de corte y empalme 5' del intrón 22, o por el contrario, enmascarando el sitio aceptor de corte y empalme 3', facilitaría el corte y empalme en trans. En las tres construcciones, el intrón artificial incluía una secuencia espaciadora (SEC ID nº 59), una secuencia de punto de ramificación de levadura conservado fuerte (SEC ID nº 25), un tramo polipirimidina (SEC ID nº 28) y un sitio aceptor de corte y empalme 3' canónico (SEC ID nº 29). Para facilitar la lectura, se decidió además utilizar el exón 24 (E24 (SEC ID nº 10)) en la molécula de CET en lugar de la versión normal del exón 23 (E23). En efecto, E24 es más pequeño que E23 (114 frente a 213 pb), permitiendo una diferenciación inequívoca mediante RT-PCR del ARNm reparado (E22-E24-E24) de los transcritos parentales no reparados (E22-E23^m-E24). De esta manera, se construyeron tres moléculas de CET para la sustitución 3': AS1-E24 (SEC ID nº 40), AS2-E24 (SEC ID nº 41) y AS3-E24 (SEC ID nº 42). A modo de control se utilizó una molécula de corte y empalme en trans sin dominio de unión (AS-, SEC ID nº 43).
15
20
25
30

Con el fin de facilitar el análisis del corte y empalme de DMD en el cultivo de tejidos, se generó un gen informador de DMD constituido por un fragmento genómico de 3.993 pb que comprendía E22 a E24 con intrones naturales de longitud completa (SEC ID nº 39). Los patrones de corte y empalme en cis y en trans se ilustran en la figura 1B. Se diseñó una estrategia de RT-PCR para detectar específicamente el ARN resultante de los sucesos de corte y empalme en cis y en trans mediante la utilización de un cebador directo E22-F (SEC ID nº 36) (flecha A en la fig. 1B) específico para E22, y un cebador inverso pSMD2-R1 (SEC ID nº 37) (flecha B) específico para una secuencia anterior a la señal poliA en el minigén DMD y las moléculas de CET. Resulta importante que dichos cebadores también permitieron discriminar los amplicones E22-E24 resultantes del corte y empalme en trans o el salto de exones.
35
40

Sustitución 3' en transcritos de DMD

Se cotransfectaron plásmidos con minigén informador de DMD y CET en la línea celular de fibroblastos NIH3T3 embrionarios de ratón. Se recolectaron las células 72 h después de la transfección y se aisló el ARN total. Se evaluaron mediante RT-PCR los patrones de ARN cortado y empalmado en cis y en trans. Tal como se esperaba, las muestras que sólo recibieron el minigén DMD expresaron un único amplicón de 638 pb correspondiente al transcrito de DMD cortado y empalmado en cis E22-E23^m-E24 (Ctrl en la fig. 1C). Además, los ADNc procedentes de las células transfectadas tanto con el minigén DMD como los constructos de corte y empalme en trans (AS2-E24) no proporcionaron productos de PCR al omitir la transcripción inversa (RT-AS2), garantizando la especificidad del presente ensayo. En presencia de plásmidos U7-SD23-BP22 (U7) que se ha descrito que inducen el salto de E23 (Goyenvalle *et al.*, 2004), se detectó una banda de 425 pb correspondiente al transcrito E22-E24 del corte y empalme en cis.
45
50

En muestras que recibieron los plásmidos con minigén DMD y CET, se generó un producto de 310 pb, correspondiente específicamente a la variante E22-E24 cortada y empalmada en trans, y no a un producto de salto de exón tal como se obtuvo con U7. En presencia de AS1-E24 (SEC ID nº 40) o AS2-E24 (SEC ID nº 41), el amplicón E22-E23^m-E24 correspondiente al minigén DMD parental prácticamente había desaparecido por completo, confirmando de esta manera que, en este caso, las eficacias de corte y empalme en trans eran prácticamente totales. Resulta importante que el corte y empalme en trans no se produjo al eliminar AS (AS-) de los constructos de CET, demostrando que esta reacción requería una interacción estrecha entre las dos cadenas de ARNm a combinar. La molécula de CET AS3-E24 (SEC ID nº 42) aparentemente resultó ser menos eficiente. Inesperadamente, la extensión de AS3 con el fin de cubrir el sitio aceptor 3' de E23^m no mejoró la reacción de corte y empalme en trans (no mostrado). Estos experimentos demuestran que el corte y empalme en trans no podían prescindir de las secuencias AS, aunque situar en posiciones más próximas a los dos ARNm no resulta suficiente.
55
60
65

Reparación del ARNm mediante la utilización de ExChange

Con el fin de someter a ensayo la posibilidad de reparación del ARNm mediante ExChange, se desarrollaron varias moléculas de ExChange (EX) AS-E24-AS' basadas en las moléculas de CET eficientes indicadas anteriormente, y se modificaron para que se uniesen tanto al intrón 22 como al intrón 23 del minigén informador de DMD (fig. 2A). Las moléculas EX contenían los mismos elementos que los indicados anteriormente en las moléculas de CET AS1-E24 y AS2-E24 seguido de un sitio donante de corte y empalme 5' (SEC ID nº 30) y un segundo intrón 23 director antisentido de 150 nt (SEC ID nº 12). Se seleccionaron cinco antisentido, AS4 (SEC ID nº 16), AS5 (SEC ID nº 17), AS6 (SEC ID nº 18), AS7 (SEC ID nº 19) y AS8 (SEC ID nº 20) dentro del intrón 23 (SEC ID nº 12), que cubrían 2.607 pb. Se utilizaron las secuencias espaciadoras siguientes: para la secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 3' del dominio de unión a diana del extremo 5' AS, se utilizó el espaciador 2 (SEC ID nº 24, 42 nucleótidos) y para la secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme 5' del dominio de unión a diana del extremo 3' AS', se utilizó el espaciador 1 (SEC ID nº 23, 34 nucleótidos).

Finalmente, se construyeron los MPT siguientes: AS1-E24-AS4 (SEC ID nº 44), AS1-E24-AS5 (SEC ID nº 45), AS1-E24-AS6 (SEC ID nº 46), AS1-E24-AS7 (SEC ID nº 47), AS2-E24-AS4 (SEC ID nº 48), AS2-E24-AS5 (SEC ID nº 49), AS2-E24-AS6 (SEC ID nº 50), AS2-E24-AS7 (SEC ID nº 51), AS2-E24-AS8 (SEC ID nº 52) y AS2-E24-2XAS4 (SEC ID nº 53).

Tal como se ha mencionado anteriormente, los constructos EX y minigén DMD se cotransfectaron en la línea celular NIH3T3. Se recolectaron las células 72 h después de la transfección y se aisló el ARN total. Con el fin de detectar específicamente el ARN resultante de los sucesos de corte y empalme en cis y/o de intercambio de exones, se utilizó un cebador directo E22-F (SEC ID nº 36) (flecha A en la fig. 2A-B) específico de E22 y un cebador inverso pSMD2-R5 (SEC ID nº 38) (flecha C) específico de una secuencia únicamente presente en el minigén DMD cadena arriba de su señal poliA. El direccionamiento de AS-E24-AS' en el pre-ARNm informador de DMD se ilustra en la figura 2A y los tamaños esperados de los diversos productos de amplificación se muestran en la figura 2B.

Se detectó un producto de RT-PCR de 408 pb en las muestras transfectadas con plásmidos AS2-E24-AS' (fig. 2C). La secuenciación directa confirmó que dicho producto correspondía a la variante de ARNm intercambiado E22-E24-E24 (fig. 2D). Dicho producto se encontraba ausente en caso de que se omitiese uno de los dos antisentidos, demostrando que el codireccionamiento de intrón 22 e intrón 23 resulta crucial para el intercambio. Entre las combinaciones de antisentidos sometidas a ensayo por los presentes inventores, los niveles de la banda de 408 pb fueron más fuertes con AS2-E24-2XAS4 (SEC ID nº 53), -AS7 (SEC ID nº 51) y -AS8 (SEC ID nº 52). Resulta interesante que la molécula AS2-E24-2XAS4 (SEC ID nº 53), que portaba dos AS4, resultó más eficiente que su contrapartida de un sólo AS4. En la muestra de AS2-E24-AS7, se detectó una banda complementaria de 294 pb correspondiente al transcrito E22-E24 generó por el salto del exón 23. Esto no resultó inesperado considerando que AS7 se unía al sitio donante de corte y empalme 5' del intrón 23 y que enmascararía su reconocimiento por parte del empalmosoma. Es probable que AS4, AS7 y AS8 volviesen a atraer moléculas EX a una posición más próxima a E23 que AS5 y AS6, sugiriendo que resulta esencial un marco estrecho para un intercambio eficiente.

Optimización de la eficacia de ExChange mediante la adición de intensificadores intrónicos de corte y empalme

Con el fin de mejorar la reacción de ExChange, se añadió el potenciador intrónico de corte y empalme (IICE, SEC ID nº 26) rico en G del gen GH-1 humano cadena arriba del sitio aceptor 3' de AS2-E24-E24 y AS2-E24-AS8 (McCarthy y Phillips, 1998) y la secuencia de DISE del gen FGFR2 de rata cadena abajo del sitio donante 5' (SEC ID nº 27) (Kierun-Duncan y Sullenger, 2007) (fig. 3A). Tal como se muestra en la figura 3B, el análisis de RT-PCR reveló que la inserción de la secuencia de DISE en las moléculas AS2-E24-AS4 (SEC ID nº 54) y AS2-E24-AS8 (SEC ID nº 55) incrementó significativamente la banda de 408 pb correspondiente a la variante de ARNm E22-E24-E24, mientras que la adición de la secuencia de IICE no incrementó la eficacia de intercambio. Tal como se esperaba, no se observó intercambio con los vectores de control que no presentan el AS' cadena abajo: AS2-IICE-E24 y AS2-E24-DISE. La figura 3C muestra la eficacia de intercambio de diversos vectores mediante la utilización de RT-PCR cuantitativa. La molécula AS2-DISE-E24-E24 (SEC ID nº 54) permitió obtener un 53% de intercambio de exones. Se mejoró su eficacia en aproximadamente 7,5 veces en comparación con su contrapartida AS2-E24-AS4 (SEC ID nº 48) que no presentaba el motivo DISE.

Resulta interesante que la introducción de dos AS' cadena abajo redundantes (en la presente memoria AS4) mejoró la eficacia de intercambio, que era de aproximadamente 30%. Sin embargo, AS2-E24-DISE-2XAS4 (SEC ID nº 57) no resultó más eficiente que AS2-DISE-E24-AS4 (SEC ID nº 54) (datos no mostrados).

2. Molécula de corte y empalme en trans simple2.1. Materiales y métodos:Construcciones de plásmido

Se construyeron los diferentes dominios de las moléculas de MCET mediante PCR y se subclonaron en pSMD2. Se

amplificaron los exones de distrofina humana 59 a 79 hasta el codón de parada (2.390 pb, ver la SEC ID nº 70) a partir de ADNc de miotubos humanos, mientras que las secuencias antisentido procedían de ADN genómico humano. La secuencia antisentido se une al intrón 58 de la distrofina: nucleótidos -445 a -295 (en la que el nucleótido +1 es el primer nucleótido de E59, SEC ID nº 68). Los casetes de corte y empalme en trans se subclonaron en el plásmido pRRL-cPPT-mcs-WPRE bajo el promotor PGK_h (Zufferey R. *et al.*, 1997). Todos los constructos se verificaron mediante secuenciación.

Secuencias

El intrón artificial incluía una secuencia espaciadora, una secuencia de punto de ramificación (PR) de levadura conservada fuerte, un tramo polipirimidina (TPP) y un sitio aceptor de corte y empalme (ACE) 3' canónico: las mismas secuencias ya indicadas para la MPT doble del Ejemplo 1.

Cultivos celulares

Se establecieron cultivos celulares de mioblastos DMD primarios a partir de explantes de bíceps tal como se ha descrito anteriormente (Mouly V. *et al.*, 1993), siguiendo la legislación francesa sobre procedimientos éticos. Se cultivaron mioblastos CHQ de DMD y de control (Edom *et al.*, 1994) en medio de crecimiento para células musculares esqueléticas (PromoCell). Para inducir la diferenciación, los cultivos se cambiaron a DMEM suero de caballo al 2% con apotransferrina (100 µg/ml) e insulina (10 µg/ml). Todos los cultivos se cultivaron en incubadores humidificados a 37°C en 5% de CO₂.

Producciones lentivíricas

Se produjeron vectores lentivíricos pseudotipados con la proteína VSV-G, mediante quadri-transfección transitoria en células 293T, determinada mediante transducción de células HCT116 y sometidas a ensayo mediante PCR en tiempo real cuantitativa en ADN genómico [Charrier S. *et al.*, 2005]. La valoración de los lentivirus se expresa como genomas víricos/ml (vg/ml) (comprendida entre 2,5x10⁹ y 5x10⁹ vg/ml). Se utilizaron 5x10⁶ vg para transducir 4x10⁵ mioblastos sembrados en placa el día anterior en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos en 500 µl de DMEM complementado con SFB al 10%. Cuatro horas después de la transducción, se diluyó el medio mediante la adición de 200 µl por pocillo del medio anterior. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y con 5% de CO₂ antes del lavado.

Análisis de RT-PCR

Se extrajo el ARN total con miotubos transducidos con reactivo TRIzol (Invitrogen). Se transcribieron inversamente cinco microgramos de ARN utilizando la mezcla SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) y el cebador inverso Pst1-WPRE-Ro, AACTGCAGcaggcggggaggcgcccaag (Ro en la fig. 2A). Los ADNc se sometieron a amplificación por PCR anidada con mezcla maestra de PCR de alta fidelidad Phusion con tampón GC (Finnzymes) bajo las condiciones siguientes: 95°C durante 5 minutos, 20 ciclos de 30 s a 95°C, 2 minutos a 56°C, 45 s a 1 minuto a 72°C, y una etapa final de 7 minutos a 72°C, utilizando los cebadores externos E58-Fo CATGAGTACTCTTGAGACTG (Fo en la fig. 2A) y WPRE-Ro AGCAGCGTATCCACATAGCG (Ro). A continuación, cinco microlitros de cada una de dichas reacciones se reamplificaron durante 30 ciclos utilizando los cebadores internos E58-Fi, AGGACTAGAGAACTCTACC (Fi) y WPRE-Ri, TTGTGACCAGCGTTTCTAG (Ri) Se separaron los productos de RT-PCR mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se secuenciaron.

Análisis de proteínas

Se cargaron cuarenta mg de proteína en un gel Bis-Tris NuPAGE® Novex 4-12% (Invitrogen), se sometieron a electroforesis, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se sondearon con 1:50 NCL-DYS1 o NCL-DYS2 (NovoCastra), seguido de la incubación con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante 1:15.000 (Jackson ImmunoResearch) y el sistema de análisis SuperSignal® West Pico (Thermo Scientific).

2.2. Resultados

El objetivo del presente trabajo era reparar mediante corte y empalme en trans simple pre-ARNm de distrofina que portaban alguna anomalía genética entre los exones 59 y 79, lo que representa el 8% de los pacientes de Duchenne. Estos pacientes no pueden tratarse con la terapia de salto de exones, ya que estos exones son indispensables para la función de la proteína.

La molécula de corte y empalme en trans simple contiene una secuencia antisentido de 150 nucleótidos complementaria al intrón 58 (SEC ID nº 68), un intrón artificial que incluye una secuencia espaciadora (SEC ID nº 23), una secuencia de punto de ramificación (PR) de levadura conservada fuerte (SEC ID nº 25), un tramo polipirimidina (TPP) (SEC ID nº 28) y un sitio aceptor de corte y empalme 3' canónico (SEC ID nº 29) y el ADNc de distrofina humana normal del exón 59 al codón de parada del exón 79 (SEC ID nº 70) (ver la figura 4). Se diseñó una

estrategia de RT-PCR para amplificar específicamente un producto de 2.443 pb a partir del ARNm resultante de sucesos de corte y empalme en trans mediante la utilización de cebadores directos, E58-Fo y E58-Fi (flechas Fo/Fi en la figura 5A), específicos para E58, y cebadores inversos, WPRE-Ro y WPRE-Ri (Ro/Ri en la figura 5A), específicos para el elemento WPRE presente en las moléculas de corte y empalme en trans.

5 Los mioblastos de pacientes de distrofia muscular de Duchenne que portaban una mutación sin sentido en el exón 70 fueron transducidos con lentivirus que expresaban moléculas de corte y empalme en trans. Tras la diferenciación, se recolectaron los miotubos, se aisló el ARN total y los transcritos de distrofina cortados y empalmados en trans se investigaron mediante RT-PCR específica. Tal como se esperaba, las muestras que no habían recibido lentivirus no proporcionaron productos de PCR (carril "-" en la figura 5B). En las muestras que expresaban moléculas de corte y empalme en trans (MCET), se generó un producto de 2.443 pb correspondiente específicamente a la variante de DMD cortada y empalmada en trans, tal como se confirmó mediante secuenciación directa del amplicón (datos no mostrados).

15 Con el fin de detectar específicamente la distrofina rescatada codificada por los transcritos cortados y empalmados en trans, se utilizó la transferencia western con el anticuerpo monoclonal NCL-DYS2, que reconoce las repeticiones R8 a R10 similares a espectrina. En concordancia con la generación de transcritos cortados y empalmados en trans, la proteína distrofina de longitud completa, de 427 kD, se detectó fácilmente mediante transferencia western en extractos de miotubos transducidos (los dos carriles MCET en la figura 6), mientras que no se observó ninguna banda en las células DMD no tratadas ("-").

Referencias bibliográficas

- 25 Chao *et al.*, 2003 Nat Med 9: 1015-1019
 Charrier S, *et al.* 2005. Gene Ther 12: 597-606.
 Chiara & Reed 1995, Nature 375: 510
 Coady *et al.*, 2008 PLoS ONE 3: e3468
 Denti *et al.*, 2006; Proc Natl Acad Sci U S A 103: 3758-3763.
 Dingwell and Laskey, 1986, Ann. Rev. Cell Biol. 2: 367-390
 30 Edom F, *et al.*, 1994. Dev Biol 164: 219-229.
 Eul *et al.*, 1995, EMBO. R 14: 3226
 Finta, C. *et al.*, 2002 J : Biol Chem 277: 5882-5890
 Goyenvalle *et al.*, 2004 Science 306: 1796-1799
 Kierlin-Duncan & Sullenger, 2007 RNA13: 1317-1327
 35 Liu *et al.*, 2005 Hum Gene Ther 16: 1116-1123.
 Mansfield *et al.*, Gene Ther. 2000 7(22): 1885-1895.
 Mansfield *et al.*, RNA 2003 9: 1290-1297
 McCarthy & Phillips, 1998 Hum Mol Genet 7: 1491-1496.
 Mouly V, *et al.*, 1993, Neuromuscul Disord 3: 371-377.
 40 Puttaraju *et al.*, Mol Ther. 2001 4(2): 105-114
 Shimizu *et al.*, 1989, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 8020
 Staley and Guthrie, 1998, Cell 92 : 315-326
 Tacke *et al.*, 1999, Curr. Opinion. Cell Biol. 11: 358-362
 Tahara *et al.*, 2004 Nat Med 10: 835-841.
 45 Takayuki Horiuchi and Toshiro Aigaki, Biol. Cell (2006) 98, 135-140
 Vellard, M. *et al.* Proc. Nat'l. Acad. Sci., 1992 89: 2511-2515
 Yokota *et al.*, 2009 Ann Neurol June ;65(6): 667-76
 Zufferey R, *et al.*, 1997. Nat Biotechnol 15: 871-875.

50 Listado de secuencias

<110> INSTITUT DE MYOLOGIE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)

55 <120> MOLÉCULAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS Y MÉTODOS PARA INTERCAMBIAR UNO O MÁS EXONES MEDIANTE CORTE Y EMPALME EN TRANS

<130> D27736

60 <150> US 61/249,702
 <151> 2009-10-08

<160> 73

65 <170> PatentIn versión 3.3

ES 2 578 993 T3

5 <210> 1
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la proteína de molécula pre-corte y empalme en trans, exón 24

10 <400> 1

```

atatatcccc agatctaaaa agaataagta tacaacatgg gatctctaga atcaacaaaa    60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagcttctc ttactagtat ttaatttcca    120
gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgaggaa cattattata    180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca    240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg    300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaca atgcagagta agaacagctc    360
tttctttcca tgggttggcc tgaattctta gttccatgta attcacaaaa tcaagttata    420
attgtcttct tttctaaaat ttatattgaa aatacatgca tcacagaaaa tttccctttc    480
aatatgatta aatgtgtggt aataactaca gatctaaaaa caattgacta aatataa     537
  
```

15 <210> 2
 <211> 636
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia de nucleótidos de la proteína de molécula pre-corte y empalme en trans, exón 23

<400> 2

```

atatatcccc agatctaaaa agaataagta tacaacatgg gatctctaga atcaacaaaa    60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagcttctc ttactagtat ttaatttcca    120
gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgaggaa cattattata    180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa caggctctgc    240
aaagttcttt gaaagagcaa caaatggct tcaactatct gagtgacact gtgaaggaga    300
tggccaagaa agcaccttca gaaatatgcc agaaatatct gtcagaattt gaagagattg    360
aggggcactg gaagaaactt tcctcccagt tgggtgaaag ctgcaaaaag ctagaagaac    420
atatgaataa gcttcgaaaa tttcaggtaa gaacagctct ttctttccat gggttggcct    480
gaattcttag ttccatgtaa ttcacaaaat caagttataa ttgtcttctt ttctaaaatt    540
tatattgaaa atacatgcat cacagaaaat ttccctttca atatgattaa aatgtgtgta    600
ataactacag atttaaaaac aattgactaa atataa     636
  
```

25 <210> 3
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> mus musculus

30

ES 2 578 993 T3

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia proteica del gen DMD de la distrofina murina, exón 23

5 <400> 3

```

Ala Leu Gln Ser Ser Leu Lys Glu Gln Gln Asn Gly Phe Asn Tyr Leu
1          5          10          15
Ser Asp Thr Val Lys Glu Met Ala Lys Lys Ala Pro Ser Glu Ile Cys
          20          25          30
Gln Lys Tyr Leu Ser Glu Phe Glu Glu Ile Glu Gly His Trp Lys Lys
          35          40          45
Leu Ser Ser Gln Leu Val Glu Ser Cys Gln Lys Leu Glu Glu His Met
          50          55          60
Asn Lys Leu Arg Lys Phe Gln
65          70
    
```

10 <210> 4
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> mus musculus

15 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia proteica del gen *DMD* de la distrofina murina, exón 24

```

<400> 4
Asn His Ile Lys Thr Leu Gln Lys Trp Met Ala Glu Val Asp Val Phe
1          5          10          15
Leu Lys Glu Glu Trp Pro Ala Leu Gly Asp Ala Glu Ile Leu Lys Lys
          20          25          30
Gln Leu Lys Gln Cys Arg
          35
    
```

20 <210> 5
 <211> 3678
 <212> PRT
 <213> mus musculus

25 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia proteica del gen *DMD* de la distrofina murina

30 <400> 5

ES 2 578 993 T3

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

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

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

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

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

Leu Arg Val Leu Gln Lys Asn Asn Val Asp Leu Val Asn Ile Gly Ser
85 90 95

Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp
100 105 110

Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val Lys Asn Val Met Lys Thr Ile Met
115 120 125

Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val
130 135 140

Arg Gln Ser Thr Arg Asn Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr
145 150 155 160

Ser Ser Trp Ser Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His
165 170 175

Arg Pro Asp Leu Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Ser Gln His Ser Ala
180 185 190

Thr Gln Arg Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Lys Cys Gln Leu Gly
195 200 205

Ile Glu Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Ala Thr Thr Tyr Pro Asp
210 215 220

Lys Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro
225 230 235 240

Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro Arg
245 250 255

Thr Ser Ser Lys Val Thr Arg Glu Glu His Phe Gln Leu His His Gln
260 265 270

ES 2 578 993 T3

Met His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly Tyr Glu
 275 280 285

Gln Thr Ser Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala Phe Thr
 290 295 300

Gln Ala Ala Tyr Val Ala Thr Ser Asp Ser Thr Gln Ser Pro Tyr Pro
 305 310 315 320

Ser Gln His Leu Glu Ala Pro Arg Asp Lys Ser Leu Asp Ser Ser Leu
 325 330 335

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

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

Glu Ile Ser Asn Asp Val Glu Glu Val Lys Glu Gln Phe His Ala His
 370 375 380

Glu Gly Phe Met Met Asp Leu Thr Ser His Gln Gly Leu Val Gly Asn
 385 390 395 400

Val Leu Gln Leu Gly Ser Gln Leu Val Gly Lys Gly Lys Leu Ser Glu
 405 410 415

Asp Glu Glu Ala Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg
 420 425 430

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

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

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

Phe Gly Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Cys Gln Val Gln Gln His Lys
 485 490 495

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

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

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

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

Leu Lys Trp Gln His Phe Thr Glu Glu Gln Cys Leu Phe Ser Thr Trp
 565 570 575

Leu Ser Glu Lys Glu Asp Ala Met Lys Asn Ile Gln Thr Ser Gly Phe
 580 585 590

Lys Asp Gln Asn Glu Met Met Ser Ser Leu His Lys Ile Ser Thr Leu
 595 600 605

Lys Ile Asp Leu Glu Lys Lys Lys Pro Thr Met Glu Lys Leu Ser Ser
 610 615 620

ES 2 578 993 T3

Leu Asn Gln Asp Leu Leu Ser Ala Leu Lys Asn Lys Ser Val Thr Gln
 625 630 635 640
 Lys Met Glu Ile Trp Met Glu Asn Phe Ala Gln Arg Trp Asp Asn Leu
 645 650 655
 Thr Gln Lys Leu Glu Lys Ser Ser Ala Gln Ile Ser Gln Ala Val Thr
 660 665 670
 Thr Thr Gln Pro Ser Leu Thr Gln Thr Thr Val Met Glu Thr Val Thr
 675 680 685
 Met Val Thr Thr Arg Glu Gln Ile Met Val Lys His Ala Gln Glu Glu
 690 695 700
 Leu Pro Pro Pro Pro Pro Gln Lys Lys Arg Gln Ile Thr Val Asp Ser
 705 710 715 720
 Glu Leu Arg Lys Arg Leu Asp Val Asp Ile Thr Glu Leu His Ser Trp
 725 730 735
 Ile Thr Arg Ser Glu Ala Val Leu Gln Ser Ser Glu Phe Ala Val Tyr
 740 745 750
 Arg Lys Glu Gly Asn Ile Ser Asp Leu Gln Glu Lys Val Asn Ala Ile
 755 760 765
 Ala Arg Glu Lys Ala Glu Lys Phe Arg Lys Leu Gln Asp Ala Ser Arg
 770 775 780
 Ser Ala Gln Ala Leu Val Glu Gln Met Ala Asn Glu Gly Val Asn Ala
 785 790 795 800
 Glu Ser Ile Arg Gln Ala Ser Glu Gln Leu Asn Ser Arg Trp Thr Glu
 805 810 815
 Phe Cys Gln Leu Leu Ser Glu Arg Val Asn Trp Leu Glu Tyr Gln Thr
 820 825 830
 Asn Ile Ile Thr Phe Tyr Asn Gln Leu Gln Gln Leu Glu Gln Met Thr
 835 840 845
 Thr Thr Ala Glu Asn Leu Leu Lys Thr Gln Ser Thr Thr Leu Ser Glu
 850 855 860
 Pro Thr Ala Ile Lys Ser Gln Leu Lys Ile Cys Lys Asp Glu Val Asn
 865 870 875 880
 Arg Leu Ser Ala Leu Gln Pro Gln Ile Glu Gln Leu Lys Ile Gln Ser
 885 890 895
 Leu Gln Leu Lys Glu Lys Gly Gln Gly Pro Met Phe Leu Asp Ala Asp
 900 905 910
 Phe Val Ala Phe Thr Asn His Phe Asn His Ile Phe Asp Gly Val Arg
 915 920 925
 Ala Lys Glu Lys Glu Leu Gln Thr Ile Phe Asp Thr Leu Pro Pro Met
 930 935 940
 Arg Tyr Gln Glu Thr Met Ser Ser Ile Arg Thr Trp Ile Gln Gln Ser
 945 950 955 960
 Glu Ser Lys Leu Ser Val Pro Tyr Leu Ser Val Thr Glu Tyr Glu Ile

ES 2 578 993 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|
| | 965 | | | | | 970 | | | | | 975 | | | | |
| Met | Glu | Glu | Arg | Leu | Gly | Lys | Leu | Gln | Ala | Leu | Gln | Ser | Ser | Leu | Lys |
| | | | 980 | | | | | 985 | | | | | 990 | | |
| Glu | Gln | Gln | Asn | Gly | Phe | Asn | Tyr | Leu | Ser | Asp | Thr | Val | Lys | Glu | Met |
| | | 995 | | | | | 1000 | | | | | 1005 | | | |
| Ala | Lys | Lys | Ala | Pro | Ser | Glu | Ile | Cys | Gln | Lys | Tyr | Leu | Ser | Glu | |
| | 1010 | | | | | 1015 | | | | | 1020 | | | | |
| Phe | Glu | Glu | Ile | Glu | Gly | His | Trp | Lys | Lys | Leu | Ser | Ser | Gln | Leu | |
| | 1025 | | | | | 1030 | | | | | 1035 | | | | |
| Val | Glu | Ser | Cys | Gln | Lys | Leu | Glu | Glu | His | Met | Asn | Lys | Leu | Arg | |
| | 1040 | | | | | 1045 | | | | | 1050 | | | | |
| Lys | Phe | Gln | Asn | His | Ile | Lys | Thr | Leu | Gln | Lys | Trp | Met | Ala | Glu | |
| | 1055 | | | | | 1060 | | | | | 1065 | | | | |
| Val | Asp | Val | Phe | Leu | Lys | Glu | Glu | Trp | Pro | Ala | Leu | Gly | Asp | Ala | |
| | 1070 | | | | | 1075 | | | | | 1080 | | | | |
| Glu | Ile | Leu | Lys | Lys | Gln | Leu | Lys | Gln | Cys | Arg | Leu | Leu | Val | Gly | |
| | 1085 | | | | | 1090 | | | | | 1095 | | | | |
| Asp | Ile | Gln | Thr | Ile | Gln | Pro | Ser | Leu | Asn | Ser | Val | Asn | Glu | Gly | |
| | 1100 | | | | | 1105 | | | | | 1110 | | | | |
| Gly | Gln | Lys | Ile | Lys | Ser | Glu | Ala | Glu | Leu | Glu | Phe | Ala | Ser | Arg | |
| | 1115 | | | | | 1120 | | | | | 1125 | | | | |
| Leu | Glu | Thr | Glu | Leu | Arg | Glu | Leu | Asn | Thr | Gln | Trp | Asp | His | Ile | |
| | 1130 | | | | | 1135 | | | | | 1140 | | | | |
| Cys | Arg | Gln | Val | Tyr | Thr | Arg | Lys | Glu | Ala | Leu | Lys | Ala | Gly | Leu | |
| | 1145 | | | | | 1150 | | | | | 1155 | | | | |
| Asp | Lys | Thr | Val | Ser | Leu | Gln | Lys | Asp | Leu | Ser | Glu | Met | His | Glu | |
| | 1160 | | | | | 1165 | | | | | 1170 | | | | |
| Trp | Met | Thr | Gln | Ala | Glu | Glu | Glu | Tyr | Leu | Glu | Arg | Asp | Phe | Glu | |
| | 1175 | | | | | 1180 | | | | | 1185 | | | | |
| Tyr | Lys | Thr | Pro | Asp | Glu | Leu | Gln | Thr | Ala | Val | Glu | Glu | Met | Lys | |
| | 1190 | | | | | 1195 | | | | | 1200 | | | | |
| Arg | Ala | Lys | Glu | Glu | Ala | Leu | Gln | Lys | Glu | Thr | Lys | Val | Lys | Leu | |
| | 1205 | | | | | 1210 | | | | | 1215 | | | | |
| Leu | Thr | Glu | Thr | Val | Asn | Ser | Val | Ile | Ala | His | Ala | Pro | Pro | Ser | |
| | 1220 | | | | | 1225 | | | | | 1230 | | | | |
| Ala | Gln | Glu | Ala | Leu | Lys | Lys | Glu | Leu | Glu | Thr | Leu | Thr | Thr | Asn | |
| | 1235 | | | | | 1240 | | | | | 1245 | | | | |
| Tyr | Gln | Trp | Leu | Cys | Thr | Arg | Leu | Asn | Gly | Lys | Cys | Lys | Thr | Leu | |
| | 1250 | | | | | 1255 | | | | | 1260 | | | | |
| Glu | Glu | Val | Trp | Ala | Cys | Trp | His | Glu | Leu | Leu | Ser | Tyr | Leu | Glu | |
| | 1265 | | | | | 1270 | | | | | 1275 | | | | |
| Lys | Ala | Asn | Lys | Trp | Leu | Asn | Glu | Val | Glu | Leu | Lys | Leu | Lys | Thr | |
| | 1280 | | | | | 1285 | | | | | 1290 | | | | |

ES 2 578 993 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Met | Glu | Asn | Val | Pro | Ala | Gly | Pro | Glu | Glu | Ile | Thr | Glu | Val | Leu |
| | 1295 | | | | | 1300 | | | | | 1305 | | | |
| Glu | Ser | Leu | Glu | Asn | Leu | Met | His | His | Ser | Glu | Glu | Asn | Pro | Asn |
| | 1310 | | | | | 1315 | | | | | 1320 | | | |
| Gln | Ile | Arg | Leu | Leu | Ala | Gln | Thr | Leu | Thr | Asp | Gly | Gly | Val | Met |
| | 1325 | | | | | 1330 | | | | | 1335 | | | |
| Asp | Glu | Leu | Ile | Asn | Glu | Glu | Leu | Glu | Thr | Phe | Asn | Ser | Arg | Trp |
| | 1340 | | | | | 1345 | | | | | 1350 | | | |
| Arg | Glu | Leu | His | Glu | Glu | Ala | Val | Arg | Lys | Gln | Lys | Leu | Leu | Glu |
| | 1355 | | | | | 1360 | | | | | 1365 | | | |
| Gln | Ser | Ile | Gln | Ser | Ala | Gln | Glu | Ile | Glu | Lys | Ser | Leu | His | Leu |
| | 1370 | | | | | 1375 | | | | | 1380 | | | |
| Ile | Gln | Glu | Ser | Leu | Glu | Phe | Ile | Asp | Lys | Gln | Leu | Ala | Ala | Tyr |
| | 1385 | | | | | 1390 | | | | | 1395 | | | |
| Ile | Thr | Asp | Lys | Val | Asp | Ala | Ala | Gln | Met | Pro | Gln | Glu | Ala | Gln |
| | 1400 | | | | | 1405 | | | | | 1410 | | | |
| Lys | Ile | Gln | Ser | Asp | Leu | Thr | Ser | His | Glu | Ile | Ser | Leu | Glu | Glu |
| | 1415 | | | | | 1420 | | | | | 1425 | | | |
| Met | Lys | Lys | His | Asn | Gln | Gly | Lys | Asp | Ala | Asn | Gln | Arg | Val | Leu |
| | 1430 | | | | | 1435 | | | | | 1440 | | | |
| Ser | Gln | Ile | Asp | Val | Ala | Gln | Lys | Lys | Leu | Gln | Asp | Val | Ser | Met |
| | 1445 | | | | | 1450 | | | | | 1455 | | | |
| Lys | Phe | Arg | Leu | Phe | Gln | Lys | Pro | Ala | Asn | Phe | Glu | Gln | Arg | Leu |
| | 1460 | | | | | 1465 | | | | | 1470 | | | |
| Glu | Glu | Ser | Lys | Met | Ile | Leu | Asp | Glu | Val | Lys | Met | His | Leu | Pro |
| | 1475 | | | | | 1480 | | | | | 1485 | | | |
| Ala | Leu | Glu | Thr | Lys | Ser | Val | Glu | Gln | Glu | Val | Ile | Gln | Ser | Gln |
| | 1490 | | | | | 1495 | | | | | 1500 | | | |
| Leu | Ser | His | Cys | Val | Asn | Leu | Tyr | Lys | Ser | Leu | Ser | Glu | Val | Lys |
| | 1505 | | | | | 1510 | | | | | 1515 | | | |
| Ser | Glu | Val | Glu | Met | Val | Ile | Lys | Thr | Gly | Arg | Gln | Ile | Val | Gln |
| | 1520 | | | | | 1525 | | | | | 1530 | | | |
| Lys | Lys | Gln | Thr | Glu | Asn | Pro | Lys | Glu | Leu | Asp | Glu | Arg | Val | Thr |
| | 1535 | | | | | 1540 | | | | | 1545 | | | |
| Ala | Leu | Lys | Leu | His | Tyr | Asn | Glu | Leu | Gly | Ala | Lys | Val | Thr | Glu |
| | 1550 | | | | | 1555 | | | | | 1560 | | | |
| Arg | Lys | Gln | Gln | Leu | Glu | Lys | Cys | Leu | Lys | Leu | Ser | Arg | Lys | Met |
| | 1565 | | | | | 1570 | | | | | 1575 | | | |
| Arg | Lys | Glu | Met | Asn | Val | Leu | Thr | Glu | Trp | Leu | Ala | Ala | Thr | Asp |
| | 1580 | | | | | 1585 | | | | | 1590 | | | |
| Thr | Glu | Leu | Thr | Lys | Arg | Ser | Ala | Val | Glu | Gly | Met | Pro | Ser | Asn |
| | 1595 | | | | | 1600 | | | | | 1605 | | | |
| Leu | Asp | Ser | Glu | Val | Ala | Trp | Gly | Lys | Ala | Thr | Gln | Lys | Glu | Ile |
| | 1610 | | | | | 1615 | | | | | 1620 | | | |

ES 2 578 993 T3

Glu Lys Gln Lys Ala His Leu Lys Ser Val Thr Glu Leu Gly Glu
 1625 1630 1635
 Ser Leu Lys Met Val Leu Gly Lys Lys Glu Thr Leu Val Glu Asp
 1640 1645 1650
 Lys Leu Ser Leu Leu Asn Ser Asn Trp Ile Ala Val Thr Ser Arg
 1655 1660 1665
 Val Glu Glu Trp Leu Asn Leu Leu Leu Glu Tyr Gln Lys His Met
 1670 1675 1680
 Glu Thr Phe Asp Gln Asn Ile Glu Gln Ile Thr Lys Trp Ile Ile
 1685 1690 1695
 His Ala Asp Glu Leu Leu Asp Glu Ser Glu Lys Lys Lys Pro Gln
 1700 1705 1710
 Gln Lys Glu Asp Ile Leu Lys Arg Leu Lys Ala Glu Met Asn Asp
 1715 1720 1725
 Met Arg Pro Lys Val Asp Ser Thr Arg Asp Gln Ala Ala Lys Leu
 1730 1735 1740
 Met Ala Asn Arg Gly Asp His Cys Arg Lys Val Val Glu Pro Gln
 1745 1750 1755
 Ile Ser Glu Leu Asn Arg Arg Phe Ala Ala Ile Ser His Arg Ile
 1760 1765 1770
 Lys Thr Gly Lys Ala Ser Ile Pro Leu Lys Glu Leu Glu Gln Phe
 1775 1780 1785
 Asn Ser Asp Ile Gln Lys Leu Leu Glu Pro Leu Glu Ala Glu Ile
 1790 1795 1800
 Gln Gln Gly Val Asn Leu Lys Glu Glu Asp Phe Asn Lys Asp Met
 1805 1810 1815
 Ser Glu Asp Asn Glu Gly Thr Val Asn Glu Leu Leu Gln Arg Gly
 1820 1825 1830
 Asp Asn Leu Gln Gln Arg Ile Thr Asp Glu Arg Lys Arg Glu Glu
 1835 1840 1845
 Ile Lys Ile Lys Gln Gln Leu Leu Gln Thr Lys His Asn Ala Leu
 1850 1855 1860
 Lys Asp Leu Arg Ser Gln Arg Arg Lys Lys Ala Leu Glu Ile Ser
 1865 1870 1875
 His Gln Trp Tyr Gln Tyr Lys Arg Gln Ala Asp Asp Leu Leu Lys
 1880 1885 1890
 Cys Leu Asp Glu Ile Glu Lys Lys Leu Ala Ser Leu Pro Glu Pro
 1895 1900 1905
 Arg Asp Glu Arg Lys Leu Lys Glu Ile Asp Arg Glu Leu Gln Lys
 1910 1915 1920
 Lys Lys Glu Glu Leu Asn Ala Val Arg Arg Gln Ala Glu Gly Leu
 1925 1930 1935
 Ser Glu Asn Gly Ala Ala Met Ala Val Glu Pro Thr Gln Ile Gln

ES 2 578 993 T3

| 1940 | 1945 | 1950 | | | | | | | | | | | | |
|---|------|------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| Leu Ser Lys Arg Trp Arg Gln Ile Glu Ser Asn Phe Ala Gln Phe 1955 1960 1965 | | | | | | | | | | | | | | |
| Arg Arg Leu Asn Phe Ala Gln Ile His Thr Leu His Glu Glu Thr 1970 1975 1980 | | | | | | | | | | | | | | |
| Met Val Val Thr Thr Glu Asp Met Pro Leu Asp Val Ser Tyr Val 1985 1990 1995 | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro Ser Thr Tyr Leu Thr Glu Ile Ser His Ile Leu Gln Ala Leu 2000 2005 2010 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser Glu Val Asp His Leu Leu Asn Thr Pro Glu Leu Cys Ala Lys 2015 2020 2025 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp Phe Glu Asp Leu Phe Lys Gln Glu Glu Ser Leu Lys Asn Ile 2030 2035 2040 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys Asp Asn Leu Gln Gln Ile Ser Gly Arg Ile Asp Ile Ile His 2045 2050 2055 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys Lys Lys Thr Ala Ala Leu Gln Ser Ala Thr Ser Met Glu Lys 2060 2065 2070 | | | | | | | | | | | | | | |
| Val Lys Val Gln Glu Ala Val Ala Gln Met Asp Phe Gln Gly Glu 2075 2080 2085 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys Leu His Arg Met Tyr Lys Glu Arg Gln Gly Arg Phe Asp Arg 2090 2095 2100 | | | | | | | | | | | | | | |
| Ser Val Glu Lys Trp Arg His Phe His Tyr Asp Met Lys Val Phe 2105 2110 2115 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn Gln Trp Leu Asn Glu Val Glu Gln Phe Phe Lys Lys Thr Gln 2120 2125 2130 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn Pro Glu Asn Trp Glu His Ala Lys Tyr Lys Trp Tyr Leu Lys 2135 2140 2145 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu Leu Gln Asp Gly Ile Gly Gln Arg Gln Ala Val Val Arg Thr 2150 2155 2160 | | | | | | | | | | | | | | |
| Leu Asn Ala Thr Gly Glu Glu Ile Ile Gln Gln Ser Ser Lys Thr 2165 2170 2175 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp Val Asn Ile Leu Gln Glu Lys Leu Gly Ser Leu Ser Leu Arg 2180 2185 2190 | | | | | | | | | | | | | | |
| Trp His Asp Ile Cys Lys Glu Leu Ala Glu Arg Arg Lys Arg Ile 2195 2200 2205 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu Glu Gln Lys Asn Val Leu Ser Glu Phe Gln Arg Asp Leu Asn 2210 2215 2220 | | | | | | | | | | | | | | |
| Glu Phe Val Leu Trp Leu Glu Glu Ala Asp Asn Ile Ala Ile Thr 2225 2230 2235 | | | | | | | | | | | | | | |
| Pro Leu Gly Asp Glu Gln Gln Leu Lys Glu Gln Leu Glu Gln Val 2240 2245 2250 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys Leu Leu Ala Glu Glu Leu Pro Leu Arg Gln Gly Ile Leu Lys 2255 2260 2265 | | | | | | | | | | | | | | |

ES 2 578 993 T3

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

Arg Pro Glu Glu Gln Asp Lys Leu Glu Lys Lys Leu Lys Gln Thr
 2285 2290 2295

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

Gly Glu Leu Glu Val His Leu Lys Asp Phe Arg Gln Leu Glu Glu
 2315 2320 2325

Gln Leu Asp His Leu Leu Leu Trp Leu Ser Pro Ile Arg Asn Gln
 2330 2335 2340

Leu Glu Ile Tyr Asn Gln Pro Ser Gln Ala Gly Pro Phe Asp Ile
 2345 2350 2355

Lys Glu Ile Glu Val Thr Val His Gly Lys Gln Ala Asp Val Glu
 2360 2365 2370

Arg Leu Leu Ser Lys Gly Gln His Leu Tyr Lys Glu Lys Pro Ser
 2375 2380 2385

Thr Gln Pro Val Lys Arg Lys Leu Glu Asp Leu Arg Ser Glu Trp
 2390 2395 2400

Glu Ala Val Asn His Leu Leu Arg Glu Leu Arg Thr Lys Gln Pro
 2405 2410 2415

Asp Arg Ala Pro Gly Leu Ser Thr Thr Gly Ala Ser Ala Ser Gln
 2420 2425 2430

Thr Val Thr Leu Val Thr Gln Ser Val Val Thr Lys Glu Thr Val
 2435 2440 2445

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

Ala Leu Ala Asp Phe Asn Arg Ala Trp Thr Glu Leu Thr Asp Trp
 2465 2470 2475

Leu Ser Leu Leu Asp Arg Val Ile Lys Ser Gln Arg Val Met Val
 2480 2485 2490

Gly Asp Leu Glu Asp Ile Asn Glu Met Ile Ile Lys Gln Lys Ala
 2495 2500 2505

Thr Leu Gln Asp Leu Glu Gln Arg Arg Pro Gln Leu Glu Glu Leu
 2510 2515 2520

Ile Thr Ala Ala Gln Asn Leu Lys Asn Lys Thr Ser Asn Gln Glu
 2525 2530 2535

Ala Arg Thr Ile Ile Thr Asp Arg Ile Glu Arg Ile Gln Ile Gln
 2540 2545 2550

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

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

Glu Ala Glu Gln Val Ile Gly Gln Val Arg Gly Lys Leu Asp Ser
 2585 2590 2595

Trp Lys Glu Gly Pro His Thr Val Asp Ala Ile Gln Lys Lys Ile
 2600 2605 2610
 Thr Glu Thr Lys Gln Leu Ala Lys Asp Leu Arg Gln Arg Gln Ile
 2615 2620 2625
 Ser Val Asp Val Ala Asn Asp Leu Ala Leu Lys Leu Leu Arg Asp
 2630 2635 2640
 Tyr Ser Ala Asp Asp Thr Arg Lys Val His Met Ile Thr Glu Asn
 2645 2650 2655
 Ile Asn Thr Ser Trp Gly Asn Ile His Lys Arg Val Ser Glu Gln
 2660 2665 2670
 Glu Ala Ala Leu Glu Glu Thr His Arg Leu Leu Gln Gln Phe Pro
 2675 2680 2685
 Leu Asp Leu Glu Lys Phe Leu Ser Trp Ile Thr Glu Ala Glu Thr
 2690 2695 2700
 Thr Ala Asn Val Leu Gln Asp Ala Ser Arg Lys Glu Lys Leu Leu
 2705 2710 2715
 Glu Asp Ser Arg Gly Val Arg Glu Leu Met Lys Pro Trp Gln Asp
 2720 2725 2730
 Leu Gln Gly Glu Ile Glu Thr His Thr Asp Ile Tyr His Asn Leu
 2735 2740 2745
 Asp Glu Asn Gly Gln Lys Ile Leu Arg Ser Leu Glu Gly Ser Asp
 2750 2755 2760
 Glu Ala Pro Leu Leu Gln Arg Arg Leu Asp Asn Met Asn Phe Lys
 2765 2770 2775
 Trp Ser Glu Leu Gln Lys Lys Ser Leu Asn Ile Arg Ser His Leu
 2780 2785 2790
 Glu Ala Ser Ser Asp Gln Trp Lys Arg Leu His Leu Ser Leu Gln
 2795 2800 2805
 Glu Leu Leu Val Trp Leu Gln Leu Lys Asp Asp Glu Leu Ser Arg
 2810 2815 2820
 Gln Ala Pro Ile Gly Gly Asp Phe Pro Ala Val Gln Lys Gln Asn
 2825 2830 2835
 Asp Ile His Arg Ala Phe Lys Arg Glu Leu Lys Thr Lys Glu Pro
 2840 2845 2850
 Val Ile Met Ser Thr Leu Glu Thr Val Arg Ile Phe Leu Thr Glu
 2855 2860 2865
 Gln Pro Leu Glu Gly Leu Glu Lys Leu Tyr Gln Glu Pro Arg Glu
 2870 2875 2880
 Leu Pro Pro Glu Glu Arg Ala Gln Asn Val Thr Arg Leu Leu Arg
 2885 2890 2895
 Lys Gln Ala Glu Glu Val Asn Ala Glu Trp Asp Lys Leu Asn Leu
 2900 2905 2910
 Arg Ser Ala Asp Trp Gln Arg Lys Ile Asp Glu Ala Leu Glu Arg

ES 2 578 993 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|--|
| 2915 | | | | | | 2920 | | | | | | 2925 | | | |
| Leu | Gln | Glu | Leu | Gln | Glu | Ala | Ala | Asp | Glu | Leu | Asp | Leu | Lys | Leu | |
| 2930 | | | | | | 2935 | | | | | 2940 | | | | |
| Arg | Gln | Ala | Glu | Val | Ile | Lys | Gly | Ser | Trp | Gln | Pro | Val | Gly | Asp | |
| 2945 | | | | | | 2950 | | | | | 2955 | | | | |
| Leu | Leu | Ile | Asp | Ser | Leu | Gln | Asp | His | Leu | Glu | Lys | Val | Lys | Ala | |
| 2960 | | | | | | 2965 | | | | | 2970 | | | | |
| Leu | Arg | Gly | Glu | Ile | Ala | Pro | Leu | Lys | Glu | Asn | Val | Asn | Arg | Val | |
| 2975 | | | | | | 2980 | | | | | 2985 | | | | |
| Asn | Asp | Leu | Ala | His | Gln | Leu | Thr | Thr | Leu | Gly | Ile | Gln | Leu | Ser | |
| 2990 | | | | | | 2995 | | | | | 3000 | | | | |
| Pro | Tyr | Asn | Leu | Ser | Thr | Leu | Glu | Asp | Leu | Asn | Thr | Arg | Trp | Arg | |
| 3005 | | | | | | 3010 | | | | | 3015 | | | | |
| Leu | Leu | Gln | Val | Ala | Val | Glu | Asp | Arg | Val | Arg | Gln | Leu | His | Glu | |
| 3020 | | | | | | 3025 | | | | | 3030 | | | | |
| Ala | His | Arg | Asp | Phe | Gly | Pro | Ala | Ser | Gln | His | Phe | Leu | Ser | Thr | |
| 3035 | | | | | | 3040 | | | | | 3045 | | | | |
| Ser | Val | Gln | Gly | Pro | Trp | Glu | Arg | Ala | Ile | Ser | Pro | Asn | Lys | Val | |
| 3050 | | | | | | 3055 | | | | | 3060 | | | | |
| Pro | Tyr | Tyr | Ile | Asn | His | Glu | Thr | Gln | Thr | Thr | Cys | Trp | Asp | His | |
| 3065 | | | | | | 3070 | | | | | 3075 | | | | |
| Pro | Lys | Met | Thr | Glu | Leu | Tyr | Gln | Ser | Leu | Ala | Asp | Leu | Asn | Asn | |
| 3080 | | | | | | 3085 | | | | | 3090 | | | | |
| Val | Arg | Phe | Ser | Ala | Tyr | Arg | Thr | Ala | Met | Lys | Leu | Arg | Arg | Leu | |
| 3095 | | | | | | 3100 | | | | | 3105 | | | | |
| Gln | Lys | Ala | Leu | Cys | Leu | Asp | Leu | Leu | Ser | Leu | Ser | Ala | Ala | Cys | |
| 3110 | | | | | | 3115 | | | | | 3120 | | | | |
| Asp | Ala | Leu | Asp | Gln | His | Asn | Leu | Lys | Gln | Asn | Asp | Gln | Pro | Met | |
| 3125 | | | | | | 3130 | | | | | 3135 | | | | |
| Asp | Ile | Leu | Gln | Ile | Ile | Asn | Cys | Leu | Thr | Thr | Ile | Tyr | Asp | Arg | |
| 3140 | | | | | | 3145 | | | | | 3150 | | | | |
| Leu | Glu | Gln | Glu | His | Asn | Asn | Leu | Val | Asn | Val | Pro | Leu | Cys | Val | |
| 3155 | | | | | | 3160 | | | | | 3165 | | | | |
| Asp | Met | Cys | Leu | Asn | Trp | Leu | Leu | Asn | Val | Tyr | Asp | Thr | Gly | Arg | |
| 3170 | | | | | | 3175 | | | | | 3180 | | | | |
| Thr | Gly | Arg | Ile | Arg | Val | Leu | Ser | Phe | Lys | Thr | Gly | Ile | Ile | Ser | |
| 3185 | | | | | | 3190 | | | | | 3195 | | | | |
| Leu | Cys | Lys | Ala | His | Leu | Glu | Asp | Lys | Tyr | Arg | Tyr | Leu | Phe | Lys | |
| 3200 | | | | | | 3205 | | | | | 3210 | | | | |
| Gln | Val | Ala | Ser | Ser | Thr | Gly | Phe | Cys | Asp | Gln | Arg | Arg | Leu | Gly | |
| 3215 | | | | | | 3220 | | | | | 3225 | | | | |
| Leu | Leu | Leu | His | Asp | Ser | Ile | Gln | Ile | Pro | Arg | Gln | Leu | Gly | Glu | |
| 3230 | | | | | | 3235 | | | | | 3240 | | | | |

ES 2 578 993 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Val | Ala | Ser | Phe | Gly | Gly | Ser | Asn | Ile | Glu | Pro | Ser | Val | Arg | Ser |
| 3245 | | | | | | 3250 | | | | | 3255 | | | |
| Cys | Phe | Gln | Phe | Ala | Asn | Asn | Lys | Pro | Glu | Ile | Glu | Ala | Ala | Leu |
| 3260 | | | | | | 3265 | | | | | 3270 | | | |
| Phe | Leu | Asp | Trp | Met | Arg | Leu | Glu | Pro | Gln | Ser | Met | Val | Trp | Leu |
| 3275 | | | | | | 3280 | | | | | 3285 | | | |
| Pro | Val | Leu | His | Arg | Val | Ala | Ala | Ala | Glu | Thr | Ala | Lys | His | Gln |
| 3290 | | | | | | 3295 | | | | | 3300 | | | |
| Ala | Lys | Cys | Asn | Ile | Cys | Lys | Glu | Cys | Pro | Ile | Ile | Gly | Phe | Arg |
| 3305 | | | | | | 3310 | | | | | 3315 | | | |
| Tyr | Arg | Ser | Leu | Lys | His | Phe | Asn | Tyr | Asp | Ile | Cys | Gln | Ser | Cys |
| 3320 | | | | | | 3325 | | | | | 3330 | | | |
| Phe | Phe | Ser | Gly | Arg | Val | Ala | Lys | Gly | His | Lys | Met | His | Tyr | Pro |
| 3335 | | | | | | 3340 | | | | | 3345 | | | |
| Met | Val | Glu | Tyr | Cys | Thr | Pro | Thr | Thr | Ser | Gly | Glu | Asp | Val | Arg |
| 3350 | | | | | | 3355 | | | | | 3360 | | | |
| Asp | Phe | Ala | Lys | Val | Leu | Lys | Asn | Lys | Phe | Arg | Thr | Lys | Arg | Tyr |
| 3365 | | | | | | 3370 | | | | | 3375 | | | |
| Phe | Ala | Lys | His | Pro | Arg | Met | Gly | Tyr | Leu | Pro | Val | Gln | Thr | Val |
| 3380 | | | | | | 3385 | | | | | 3390 | | | |
| Leu | Glu | Gly | Asp | Asn | Met | Glu | Thr | Pro | Val | Thr | Leu | Ile | Asn | Phe |
| 3395 | | | | | | 3400 | | | | | 3405 | | | |
| Trp | Pro | Val | Asp | Ser | Ala | Pro | Ala | Ser | Ser | Pro | Gln | Leu | Ser | His |
| 3410 | | | | | | 3415 | | | | | 3420 | | | |
| Asp | Asp | Thr | His | Ser | Arg | Ile | Glu | His | Tyr | Ala | Ser | Arg | Leu | Ala |
| 3425 | | | | | | 3430 | | | | | 3435 | | | |
| Glu | Met | Glu | Asn | Ser | Asn | Gly | Ser | Tyr | Leu | Asn | Asp | Ser | Ile | Ser |
| 3440 | | | | | | 3445 | | | | | 3450 | | | |
| Pro | Asn | Glu | Ser | Ile | Asp | Asp | Glu | His | Leu | Leu | Ile | Gln | His | Tyr |
| 3455 | | | | | | 3460 | | | | | 3465 | | | |
| Cys | Gln | Ser | Leu | Asn | Gln | Asp | Ser | Pro | Leu | Ser | Gln | Pro | Arg | Ser |
| 3470 | | | | | | 3475 | | | | | 3480 | | | |
| Pro | Ala | Gln | Ile | Leu | Ile | Ser | Leu | Glu | Ser | Glu | Glu | Arg | Gly | Glu |
| 3485 | | | | | | 3490 | | | | | 3495 | | | |
| Leu | Glu | Arg | Ile | Leu | Ala | Asp | Leu | Glu | Glu | Glu | Asn | Arg | Asn | Leu |
| 3500 | | | | | | 3505 | | | | | 3510 | | | |
| Gln | Ala | Glu | Tyr | Asp | Arg | Leu | Lys | Gln | Gln | His | Glu | His | Lys | Gly |
| 3515 | | | | | | 3520 | | | | | 3525 | | | |
| Leu | Ser | Pro | Leu | Pro | Ser | Pro | Pro | Glu | Met | Met | Pro | Thr | Ser | Pro |
| 3530 | | | | | | 3535 | | | | | 3540 | | | |
| Gln | Ser | Pro | Arg | Asp | Ala | Glu | Leu | Ile | Ala | Glu | Ala | Lys | Leu | Leu |
| 3545 | | | | | | 3550 | | | | | 3555 | | | |
| Arg | Gln | His | Lys | Gly | Arg | Leu | Glu | Ala | Arg | Met | Gln | Ile | Leu | Glu |
| 3560 | | | | | | 3565 | | | | | 3570 | | | |

ES 2 578 993 T3

Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser Gln Leu His Arg Leu Arg Gln
 3575 3580 3585
 Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr
 3590 3595 3600
 Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln
 3605 3610 3615
 Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly Ser Gln Thr Ser Glu Ser Met
 3620 3625 3630
 Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly
 3635 3640 3645
 Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser
 3650 3655 3660
 Arg Gly Arg Asn Ala Pro Gly Lys Pro Met Arg Glu Asp Thr Met
 3665 3670 3675

<210> 6
 <211> 3685
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia proteica del gen DMD de la distrofina humana

10

<400> 6

Met Leu Trp Trp Glu Glu Val Glu Asp Cys Tyr Glu Arg Glu Asp Val
 1 5 10 15
 Gln Lys Lys Thr Phe Thr Lys Trp Val Asn Ala Gln Phe Ser Lys Phe
 20 25 30
 Gly Lys Gln His Ile Glu Asn Leu Phe Ser Asp Leu Gln Asp Gly Arg
 35 40 45
 Arg Leu Leu Asp Leu Leu Glu Gly Leu Thr Gly Gln Lys Leu Pro Lys
 50 55 60
 Glu Lys Gly Ser Thr Arg Val His Ala Leu Asn Asn Val Asn Lys Ala
 65 70 75 80
 Leu Arg Val Leu Gln Asn Asn Asn Val Asp Leu Val Asn Ile Gly Ser
 85 90 95
 Thr Asp Ile Val Asp Gly Asn His Lys Leu Thr Leu Gly Leu Ile Trp
 100 105 110
 Asn Ile Ile Leu His Trp Gln Val Lys Asn Val Met Lys Asn Ile Met
 115 120 125
 Ala Gly Leu Gln Gln Thr Asn Ser Glu Lys Ile Leu Leu Ser Trp Val
 130 135 140
 Arg Gln Ser Thr Arg Asn Tyr Pro Gln Val Asn Val Ile Asn Phe Thr
 145 150 155 160

ES 2 578 993 T3

Thr Ser Trp Ser Asp Gly Leu Ala Leu Asn Ala Leu Ile His Ser His
 165 170 175
 Arg Pro Asp Leu Phe Asp Trp Asn Ser Val Val Cys Gln Gln Ser Ala
 180 185 190
 Thr Gln Arg Leu Glu His Ala Phe Asn Ile Ala Arg Tyr Gln Leu Gly
 195 200 205
 Ile Glu Lys Leu Leu Asp Pro Glu Asp Val Asp Thr Thr Tyr Pro Asp
 210 215 220
 Lys Lys Ser Ile Leu Met Tyr Ile Thr Ser Leu Phe Gln Val Leu Pro
 225 230 235 240
 Gln Gln Val Ser Ile Glu Ala Ile Gln Glu Val Glu Met Leu Pro Arg
 245 250 255
 Pro Pro Lys Val Thr Lys Glu Glu His Phe Gln Leu His His Gln Met
 260 265 270
 His Tyr Ser Gln Gln Ile Thr Val Ser Leu Ala Gln Gly Tyr Glu Arg
 275 280 285
 Thr Ser Ser Pro Lys Pro Arg Phe Lys Ser Tyr Ala Tyr Thr Gln Ala
 290 295 300
 Ala Tyr Val Thr Thr Ser Asp Pro Thr Arg Ser Pro Phe Pro Ser Gln
 305 310 315 320
 His Leu Glu Ala Pro Glu Asp Lys Ser Phe Gly Ser Ser Leu Met Glu
 325 330 335
 Ser Glu Val Asn Leu Asp Arg Tyr Gln Thr Ala Leu Glu Glu Val Leu
 340 345 350
 Ser Trp Leu Leu Ser Ala Glu Asp Thr Leu Gln Ala Gln Gly Glu Ile
 355 360 365
 Ser Asn Asp Val Glu Val Val Lys Asp Gln Phe His Thr His Glu Gly
 370 375 380
 Tyr Met Met Asp Leu Thr Ala His Gln Gly Arg Val Gly Asn Ile Leu
 385 390 395 400
 Gln Leu Gly Ser Lys Leu Ile Gly Thr Gly Lys Leu Ser Glu Asp Glu
 405 410 415
 Glu Thr Glu Val Gln Glu Gln Met Asn Leu Leu Asn Ser Arg Trp Glu
 420 425 430
 Cys Leu Arg Val Ala Ser Met Glu Lys Gln Ser Asn Leu His Arg Val
 435 440 445
 Leu Met Asp Leu Gln Asn Gln Lys Leu Lys Glu Leu Asn Asp Trp Leu
 450 455 460
 Thr Lys Thr Glu Glu Arg Thr Arg Lys Met Glu Glu Glu Pro Leu Gly
 465 470 475 480
 Pro Asp Leu Glu Asp Leu Lys Arg Gln Val Gln Gln His Lys Val Leu
 485 490 495
 Gln Glu Asp Leu Glu Gln Glu Gln Val Arg Val Asn Ser Leu Thr His
 500 505 510

ES 2 578 993 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Glu Asn Trp Leu Lys Ile Gln Pro Thr Thr Pro Ser Glu Pro Thr

ES 2 578 993 T3

| | | | | |
|---|--|------|--|-------------|
| 850 | | 855 | | 860 |
| Ala Ile Lys Ser Gln Leu Lys Ile Cys Lys Asp Glu Val Asn Arg Leu | | | | |
| 865 | | 870 | | 875 880 |
| Ser Gly Leu Gln Pro Gln Ile Glu Arg Leu Lys Ile Gln Ser Ile Ala | | | | |
| | | 885 | | 890 895 |
| Leu Lys Glu Lys Gly Gln Gly Pro Met Phe Leu Asp Ala Asp Phe Val | | | | |
| | | 900 | | 905 910 |
| Ala Phe Thr Asn His Phe Lys Gln Val Phe Ser Asp Val Gln Ala Arg | | | | |
| | | 915 | | 920 925 |
| Glu Lys Glu Leu Gln Thr Ile Phe Asp Thr Leu Pro Pro Met Arg Tyr | | | | |
| | | 930 | | 935 940 |
| Gln Glu Thr Met Ser Ala Ile Arg Thr Trp Val Gln Gln Ser Glu Thr | | | | |
| | | 945 | | 950 955 960 |
| Lys Leu Ser Ile Pro Gln Leu Ser Val Thr Asp Tyr Glu Ile Met Glu | | | | |
| | | 965 | | 970 975 |
| Gln Arg Leu Gly Glu Leu Gln Ala Leu Gln Ser Ser Leu Gln Glu Gln | | | | |
| | | 980 | | 985 990 |
| Gln Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu Ser Thr Thr Val Lys Glu Met Ser Lys | | | | |
| | | 995 | | 1000 1005 |
| Lys Ala Pro Ser Glu Ile Ser Arg Lys Tyr Gln Ser Glu Phe Glu | | | | |
| | | 1010 | | 1015 1020 |
| Glu Ile Glu Gly Arg Trp Lys Lys Leu Ser Ser Gln Leu Val Glu | | | | |
| | | 1025 | | 1030 1035 |
| His Cys Gln Lys Leu Glu Glu Gln Met Asn Lys Leu Arg Lys Ile | | | | |
| | | 1040 | | 1045 1050 |
| Gln Asn His Ile Gln Thr Leu Lys Lys Trp Met Ala Glu Val Asp | | | | |
| | | 1055 | | 1060 1065 |
| Val Phe Leu Lys Glu Glu Trp Pro Ala Leu Gly Asp Ser Glu Ile | | | | |
| | | 1070 | | 1075 1080 |
| Leu Lys Lys Gln Leu Lys Gln Cys Arg Leu Leu Val Ser Asp Ile | | | | |
| | | 1085 | | 1090 1095 |
| Gln Thr Ile Gln Pro Ser Leu Asn Ser Val Asn Glu Gly Gly Gln | | | | |
| | | 1100 | | 1105 1110 |
| Lys Ile Lys Asn Glu Ala Glu Pro Glu Phe Ala Ser Arg Leu Glu | | | | |
| | | 1115 | | 1120 1125 |
| Thr Glu Leu Lys Glu Leu Asn Thr Gln Trp Asp His Met Cys Gln | | | | |
| | | 1130 | | 1135 1140 |
| Gln Val Tyr Ala Arg Lys Glu Ala Leu Lys Gly Gly Leu Glu Lys | | | | |
| | | 1145 | | 1150 1155 |
| Thr Val Ser Leu Gln Lys Asp Leu Ser Glu Met His Glu Trp Met | | | | |
| | | 1160 | | 1165 1170 |
| Thr Gln Ala Glu Glu Glu Tyr Leu Glu Arg Asp Phe Glu Tyr Lys | | | | |
| | | 1175 | | 1180 1185 |

ES 2 578 993 T3

Thr Pro Asp Glu Leu Gln Lys Ala Val Glu Glu Met Lys Arg Ala
 1190 1195 1200

Lys Glu Glu Ala Gln Gln Lys Glu Ala Lys Val Lys Leu Leu Thr
 1205 1210 1215

Glu Ser Val Asn Ser Val Ile Ala Gln Ala Pro Pro Val Ala Gln
 1220 1225 1230

Glu Ala Leu Lys Lys Glu Leu Glu Thr Leu Thr Thr Asn Tyr Gln
 1235 1240 1245

Trp Leu Cys Thr Arg Leu Asn Gly Lys Cys Lys Thr Leu Glu Glu
 1250 1255 1260

Val Trp Ala Cys Trp His Glu Leu Leu Ser Tyr Leu Glu Lys Ala
 1265 1270 1275

Asn Lys Trp Leu Asn Glu Val Glu Phe Lys Leu Lys Thr Thr Glu
 1280 1285 1290

Asn Ile Pro Gly Gly Ala Glu Glu Ile Ser Glu Val Leu Asp Ser
 1295 1300 1305

Leu Glu Asn Leu Met Arg His Ser Glu Asp Asn Pro Asn Gln Ile
 1310 1315 1320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Val | Glu | Met | Val | Ile | Lys | Thr | Gly | Arg | Gln | Ile | Val | Gln | Lys | Lys |
| 1520 | | | | | | 1525 | | | | | 1530 | | | |
| Gln | Thr | Glu | Asn | Pro | Lys | Glu | Leu | Asp | Glu | Arg | Val | Thr | Ala | Leu |
| 1535 | | | | | | 1540 | | | | | 1545 | | | |
| Lys | Leu | His | Tyr | Asn | Glu | Leu | Gly | Ala | Lys | Val | Thr | Glu | Arg | Lys |
| 1550 | | | | | | 1555 | | | | | 1560 | | | |
| Gln | Gln | Leu | Glu | Lys | Cys | Leu | Lys | Leu | Ser | Arg | Lys | Met | Arg | Lys |
| 1565 | | | | | | 1570 | | | | | 1575 | | | |
| Glu | Met | Asn | Val | Leu | Thr | Glu | Trp | Leu | Ala | Ala | Thr | Asp | Met | Glu |
| 1580 | | | | | | 1585 | | | | | 1590 | | | |
| Leu | Thr | Lys | Arg | Ser | Ala | Val | Glu | Gly | Met | Pro | Ser | Asn | Leu | Asp |
| 1595 | | | | | | 1600 | | | | | 1605 | | | |
| Ser | Glu | Val | Ala | Trp | Gly | Lys | Ala | Thr | Gln | Lys | Glu | Ile | Glu | Lys |
| 1610 | | | | | | 1615 | | | | | 1620 | | | |
| Gln | Lys | Val | His | Leu | Lys | Ser | Ile | Thr | Glu | Val | Gly | Glu | Ala | Leu |
| 1625 | | | | | | 1630 | | | | | 1635 | | | |
| Lys | Thr | Val | Leu | Gly | Lys | Lys | Glu | Thr | Leu | Val | Glu | Asp | Lys | Leu |
| 1640 | | | | | | 1645 | | | | | 1650 | | | |
| Ser | Leu | Leu | Asn | Ser | Asn | Trp | Ile | Ala | Val | Thr | Ser | Arg | Ala | Glu |
| 1655 | | | | | | 1660 | | | | | 1665 | | | |
| Glu | Trp | Leu | Asn | Leu | Leu | Leu | Glu | Tyr | Gln | Lys | His | Met | Glu | Thr |
| 1670 | | | | | | 1675 | | | | | 1680 | | | |
| Phe | Asp | Gln | Asn | Val | Asp | His | Ile | Thr | Lys | Trp | Ile | Ile | Gln | Ala |
| 1685 | | | | | | 1690 | | | | | 1695 | | | |
| Asp | Thr | Leu | Leu | Asp | Glu | Ser | Glu | Lys | Lys | Lys | Pro | Gln | Gln | Lys |
| 1700 | | | | | | 1705 | | | | | 1710 | | | |
| Glu | Asp | Val | Leu | Lys | Arg | Leu | Lys | Ala | Glu | Leu | Asn | Asp | Ile | Arg |
| 1715 | | | | | | 1720 | | | | | 1725 | | | |
| Pro | Lys | Val | Asp | Ser | Thr | Arg | Asp | Gln | Ala | Ala | Asn | Leu | Met | Ala |
| 1730 | | | | | | 1735 | | | | | 1740 | | | |
| Asn | Arg | Gly | Asp | His | Cys | Arg | Lys | Leu | Val | Glu | Pro | Gln | Ile | Ser |
| 1745 | | | | | | 1750 | | | | | 1755 | | | |
| Glu | Leu | Asn | His | Arg | Phe | Ala | Ala | Ile | Ser | His | Arg | Ile | Lys | Thr |
| 1760 | | | | | | 1765 | | | | | 1770 | | | |
| Gly | Lys | Ala | Ser | Ile | Pro | Leu | Lys | Glu | Leu | Glu | Gln | Phe | Asn | Ser |
| 1775 | | | | | | 1780 | | | | | 1785 | | | |
| Asp | Ile | Gln | Lys | Leu | Leu | Glu | Pro | Leu | Glu | Ala | Glu | Ile | Gln | Gln |
| 1790 | | | | | | 1795 | | | | | 1800 | | | |
| Gly | Val | Asn | Leu | Lys | Glu | Glu | Asp | Phe | Asn | Lys | Asp | Met | Asn | Glu |
| 1805 | | | | | | 1810 | | | | | 1815 | | | |
| Asp | Asn | Glu | Gly | Thr | Val | Lys | Glu | Leu | Leu | Gln | Arg | Gly | Asp | Asn |
| 1820 | | | | | | 1825 | | | | | 1830 | | | |
| Leu | Gln | Gln | Arg | Ile | Thr | Asp | Glu | Arg | Lys | Arg | Glu | Glu | Ile | Lys |

ES 2 578 993 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|-----|-----|--|
| 1835 | | | | | | 1840 | | | | | | 1845 | | | |
| Ile | Lys | Gln | Gln | Leu | Leu | Gln | Thr | Lys | His | Asn | Ala | Leu | Lys | Asp | |
| 1850 | | | | | | 1855 | | | | | 1860 | | | | |
| Leu | Arg | Ser | Gln | Arg | Arg | Lys | Lys | Ala | Leu | Glu | Ile | Ser | His | Gln | |
| 1865 | | | | | | 1870 | | | | | 1875 | | | | |
| Trp | Tyr | Gln | Tyr | Lys | Arg | Gln | Ala | Asp | Asp | Leu | Leu | Lys | Cys | Leu | |
| 1880 | | | | | | 1885 | | | | | 1890 | | | | |
| Asp | Asp | Ile | Glu | Lys | Lys | Leu | Ala | Ser | Leu | Pro | Glu | Pro | Arg | Asp | |
| 1895 | | | | | | 1900 | | | | | 1905 | | | | |
| Glu | Arg | Lys | Ile | Lys | Glu | Ile | Asp | Arg | Glu | Leu | Gln | Lys | Lys | Lys | |
| 1910 | | | | | | 1915 | | | | | 1920 | | | | |
| Glu | Glu | Leu | Asn | Ala | Val | Arg | Arg | Gln | Ala | Glu | Gly | Leu | Ser | Glu | |
| 1925 | | | | | | 1930 | | | | | 1935 | | | | |
| Asp | Gly | Ala | Ala | Met | Ala | Val | Glu | Pro | Thr | Gln | Ile | Gln | Leu | Ser | |
| 1940 | | | | | | 1945 | | | | | 1950 | | | | |
| Lys | Arg | Trp | Arg | Glu | Ile | Glu | Ser | Lys | Phe | Ala | Gln | Phe | Arg | Arg | |
| 1955 | | | | | | 1960 | | | | | 1965 | | | | |
| Leu | Asn | Phe | Ala | Gln | Ile | His | Thr | Val | Arg | Glu | Glu | Thr | Met | Met | |
| 1970 | | | | | | 1975 | | | | | 1980 | | | | |
| Val | Met | Thr | Glu | Asp | Met | Pro | Leu | Glu | Ile | Ser | Tyr | Val | Pro | Ser | |
| 1985 | | | | | | 1990 | | | | | 1995 | | | | |
| Thr | Tyr | Leu | Thr | Glu | Ile | Thr | His | Val | Ser | Gln | Ala | Leu | Leu | Glu | |
| 2000 | | | | | | 2005 | | | | | 2010 | | | | |
| Val | Glu | Gln | Leu | Leu | Asn | Ala | Pro | Asp | Leu | Cys | Ala | Lys | Asp | Phe | |
| 2015 | | | | | | 2020 | | | | | 2025 | | | | |
| Glu | Asp | Leu | Phe | Lys | Gln | Glu | Glu | Ser | Leu | Lys | Asn | Ile | Lys | Asp | |
| 2030 | | | | | | 2035 | | | | | 2040 | | | | |
| Ser | Leu | Gln | Gln | Ser | Ser | Gly | Arg | Ile | Asp | Ile | Ile | His | Ser | Lys | |
| 2045 | | | | | | 2050 | | | | | 2055 | | | | |
| Lys | Thr | Ala | Ala | Leu | Gln | Ser | Ala | Thr | Pro | Val | Glu | Arg | Val | Lys | |
| 2060 | | | | | | 2065 | | | | | 2070 | | | | |
| Leu | Gln | Glu | Ala | Leu | Ser | Gln | Leu | Asp | Phe | Gln | Trp | Glu | Lys | Val | |
| 2075 | | | | | | 2080 | | | | | 2085 | | | | |
| Asn | Lys | Met | Tyr | Lys | Asp | Arg | Gln | Gly | Arg | Phe | Asp | Arg | Ser | Val | |
| 2090 | | | | | | 2095 | | | | | 2100 | | | | |
| Glu | Lys | Trp | Arg | Arg | Phe | His | Tyr | Asp | Ile | Lys | Ile | Phe | Asn | Gln | |
| 2105 | | | | | | 2110 | | | | | 2115 | | | | |
| Trp | Leu | Thr | Glu | Ala | Glu | Gln | Phe | Leu | Arg | Lys | Thr | Gln | Ile | Pro | |
| 2120 | | | | | | 2125 | | | | | 2130 | | | | |
| Glu | Asn | Trp | Glu | His | Ala | Lys | Tyr | Lys | Trp | Tyr | Leu | Lys | Glu | Leu | |
| 2135 | | | | | | 2140 | | | | | 2145 | | | | |
| Gln | Asp | Gly | Ile | Gly | Gln | Arg | Gln | Thr | Val | Val | Arg | Thr | Leu | Asn | |
| 2150 | | | | | | 2155 | | | | | 2160 | | | | |

ES 2 578 993 T3

Ala Thr Gly Glu Glu Ile Ile Gln Gln Ser Ser Lys Thr Asp Ala
 2165 2170 2175

Ser Ile Leu Gln Glu Lys Leu Gly Ser Leu Asn Leu Arg Trp Gln
 2180 2185 2190

Glu Val Cys Lys Gln Leu Ser Asp Arg Lys Lys Arg Leu Glu Glu
 2195 2200 2205

Gln Lys Asn Ile Leu Ser Glu Phe Gln Arg Asp Leu Asn Glu Phe
 2210 2215 2220

Val Leu Trp Leu Glu Glu Ala Asp Asn Ile Ala Ser Ile Pro Leu
 2225 2230 2235

Glu Pro Gly Lys Glu Gln Gln Leu Lys Glu Lys Leu Glu Gln Val
 2240 2245 2250

Lys Leu Leu Val Glu Glu Leu Pro Leu Arg Gln Gly Ile Leu Lys
 2255 2260 2265

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 578 993 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
| Lys | Ser | Gln | Arg | Val | Met | Val | Gly | Asp | Leu | Glu | Asp | Ile | Asn | Glu |
| 2495 | | | | | | 2500 | | | | | 2505 | | | |
| Met | Ile | Ile | Lys | Gln | Lys | Ala | Thr | Met | Gln | Asp | Leu | Glu | Gln | Arg |
| 2510 | | | | | | 2515 | | | | | 2520 | | | |
| Arg | Pro | Gln | Leu | Glu | Glu | Leu | Ile | Thr | Ala | Ala | Gln | Asn | Leu | Lys |
| 2525 | | | | | | 2530 | | | | | 2535 | | | |
| Asn | Lys | Thr | Ser | Asn | Gln | Glu | Ala | Arg | Thr | Ile | Ile | Thr | Asp | Arg |
| 2540 | | | | | | 2545 | | | | | 2550 | | | |
| Ile | Glu | Arg | Ile | Gln | Asn | Gln | Trp | Asp | Glu | Val | Gln | Glu | His | Leu |
| 2555 | | | | | | 2560 | | | | | 2565 | | | |
| Gln | Asn | Arg | Arg | Gln | Gln | Leu | Asn | Glu | Met | Leu | Lys | Asp | Ser | Thr |
| 2570 | | | | | | 2575 | | | | | 2580 | | | |
| Gln | Trp | Leu | Glu | Ala | Lys | Glu | Glu | Ala | Glu | Gln | Val | Leu | Gly | Gln |
| 2585 | | | | | | 2590 | | | | | 2595 | | | |
| Ala | Arg | Ala | Lys | Leu | Glu | Ser | Trp | Lys | Glu | Gly | Pro | Tyr | Thr | Val |
| 2600 | | | | | | 2605 | | | | | 2610 | | | |
| Asp | Ala | Ile | Gln | Lys | Lys | Ile | Thr | Glu | Thr | Lys | Gln | Leu | Ala | Lys |
| 2615 | | | | | | 2620 | | | | | 2625 | | | |
| Asp | Leu | Arg | Gln | Trp | Gln | Thr | Asn | Val | Asp | Val | Ala | Asn | Asp | Leu |
| 2630 | | | | | | 2635 | | | | | 2640 | | | |
| Ala | Leu | Lys | Leu | Leu | Arg | Asp | Tyr | Ser | Ala | Asp | Asp | Thr | Arg | Lys |
| 2645 | | | | | | 2650 | | | | | 2655 | | | |
| Val | His | Met | Ile | Thr | Glu | Asn | Ile | Asn | Ala | Ser | Trp | Arg | Ser | Ile |
| 2660 | | | | | | 2665 | | | | | 2670 | | | |
| His | Lys | Arg | Val | Ser | Glu | Arg | Glu | Ala | Ala | Leu | Glu | Glu | Thr | His |
| 2675 | | | | | | 2680 | | | | | 2685 | | | |
| Arg | Leu | Leu | Gln | Gln | Phe | Pro | Leu | Asp | Leu | Glu | Lys | Phe | Leu | Ala |
| 2690 | | | | | | 2695 | | | | | 2700 | | | |
| Trp | Leu | Thr | Glu | Ala | Glu | Thr | Thr | Ala | Asn | Val | Leu | Gln | Asp | Ala |
| 2705 | | | | | | 2710 | | | | | 2715 | | | |
| Thr | Arg | Lys | Glu | Arg | Leu | Leu | Glu | Asp | Ser | Lys | Gly | Val | Lys | Glu |
| 2720 | | | | | | 2725 | | | | | 2730 | | | |
| Leu | Met | Lys | Gln | Trp | Gln | Asp | Leu | Gln | Gly | Glu | Ile | Glu | Ala | His |
| 2735 | | | | | | 2740 | | | | | 2745 | | | |
| Thr | Asp | Val | Tyr | His | Asn | Leu | Asp | Glu | Asn | Ser | Gln | Lys | Ile | Leu |
| 2750 | | | | | | 2755 | | | | | 2760 | | | |
| Arg | Ser | Leu | Glu | Gly | Ser | Asp | Asp | Ala | Val | Leu | Leu | Gln | Arg | Arg |
| 2765 | | | | | | 2770 | | | | | 2775 | | | |
| Leu | Asp | Asn | Met | Asn | Phe | Lys | Trp | Ser | Glu | Leu | Arg | Lys | Lys | Ser |
| 2780 | | | | | | 2785 | | | | | 2790 | | | |
| Leu | Asn | Ile | Arg | Ser | His | Leu | Glu | Ala | Ser | Ser | Asp | Gln | Trp | Lys |
| 2795 | | | | | | 2800 | | | | | 2805 | | | |
| Arg | Leu | His | Leu | Ser | Leu | Gln | Glu | Leu | Leu | Val | Trp | Leu | Gln | Leu |

ES 2 578 993 T3

| | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|
| 2810 | | | | | | 2815 | | | | | | | | 2820 |
| Lys | Asp | Asp | Glu | Leu | Ser | Arg | Gln | Ala | Pro | Ile | Gly | Gly | Asp | Phe |
| 2825 | | | | | | 2830 | | | | | 2835 | | | |
| Pro | Ala | Val | Gln | Lys | Gln | Asn | Asp | Val | His | Arg | Ala | Phe | Lys | Arg |
| 2840 | | | | | | 2845 | | | | | 2850 | | | |
| Glu | Leu | Lys | Thr | Lys | Glu | Pro | Val | Ile | Met | Ser | Thr | Leu | Glu | Thr |
| 2855 | | | | | | 2860 | | | | | 2865 | | | |
| Val | Arg | Ile | Phe | Leu | Thr | Glu | Gln | Pro | Leu | Glu | Gly | Leu | Glu | Lys |
| 2870 | | | | | | 2875 | | | | | 2880 | | | |
| Leu | Tyr | Gln | Glu | Pro | Arg | Glu | Leu | Pro | Pro | Glu | Glu | Arg | Ala | Gln |
| 2885 | | | | | | 2890 | | | | | 2895 | | | |
| Asn | Val | Thr | Arg | Leu | Leu | Arg | Lys | Gln | Ala | Glu | Glu | Val | Asn | Thr |
| 2900 | | | | | | 2905 | | | | | 2910 | | | |
| Glu | Trp | Glu | Lys | Leu | Asn | Leu | His | Ser | Ala | Asp | Trp | Gln | Arg | Lys |
| 2915 | | | | | | 2920 | | | | | 2925 | | | |
| Ile | Asp | Glu | Thr | Leu | Glu | Arg | Leu | Gln | Glu | Leu | Gln | Glu | Ala | Thr |
| 2930 | | | | | | 2935 | | | | | 2940 | | | |
| Asp | Glu | Leu | Asp | Leu | Lys | Leu | Arg | Gln | Ala | Glu | Val | Ile | Lys | Gly |
| 2945 | | | | | | 2950 | | | | | 2955 | | | |
| Ser | Trp | Gln | Pro | Val | Gly | Asp | Leu | Leu | Ile | Asp | Ser | Leu | Gln | Asp |
| 2960 | | | | | | 2965 | | | | | 2970 | | | |
| His | Leu | Glu | Lys | Val | Lys | Ala | Leu | Arg | Gly | Glu | Ile | Ala | Pro | Leu |
| 2975 | | | | | | 2980 | | | | | 2985 | | | |
| Lys | Glu | Asn | Val | Ser | His | Val | Asn | Asp | Leu | Ala | Arg | Gln | Leu | Thr |
| 2990 | | | | | | 2995 | | | | | 3000 | | | |
| Thr | Leu | Gly | Ile | Gln | Leu | Ser | Pro | Tyr | Asn | Leu | Ser | Thr | Leu | Glu |
| 3005 | | | | | | 3010 | | | | | 3015 | | | |
| Asp | Leu | Asn | Thr | Arg | Trp | Lys | Leu | Leu | Gln | Val | Ala | Val | Glu | Asp |
| 3020 | | | | | | 3025 | | | | | 3030 | | | |
| Arg | Val | Arg | Gln | Leu | His | Glu | Ala | His | Arg | Asp | Phe | Gly | Pro | Ala |
| 3035 | | | | | | 3040 | | | | | 3045 | | | |
| Ser | Gln | His | Phe | Leu | Ser | Thr | Ser | Val | Gln | Gly | Pro | Trp | Glu | Arg |
| 3050 | | | | | | 3055 | | | | | 3060 | | | |
| Ala | Ile | Ser | Pro | Asn | Lys | Val | Pro | Tyr | Tyr | Ile | Asn | His | Glu | Thr |
| 3065 | | | | | | 3070 | | | | | 3075 | | | |
| Gln | Thr | Thr | Cys | Trp | Asp | His | Pro | Lys | Met | Thr | Glu | Leu | Tyr | Gln |
| 3080 | | | | | | 3085 | | | | | 3090 | | | |
| Ser | Leu | Ala | Asp | Leu | Asn | Asn | Val | Arg | Phe | Ser | Ala | Tyr | Arg | Thr |
| 3095 | | | | | | 3100 | | | | | 3105 | | | |
| Ala | Met | Lys | Leu | Arg | Arg | Leu | Gln | Lys | Ala | Leu | Cys | Leu | Asp | Leu |
| 3110 | | | | | | 3115 | | | | | 3120 | | | |
| Leu | Ser | Leu | Ser | Ala | Ala | Cys | Asp | Ala | Leu | Asp | Gln | His | Asn | Leu |
| 3125 | | | | | | 3130 | | | | | 3135 | | | |

ES 2 578 993 T3

Lys Gln Asn Asp Gln Pro Met Asp Ile Leu Gln Ile Ile Asn Cys
 3140 3145 3150
 Leu Thr Thr Ile Tyr Asp Arg Leu Glu Gln Glu His Asn Asn Leu
 3155 3160 3165
 Val Asn Val Pro Leu Cys Val Asp Met Cys Leu Asn Trp Leu Leu
 3170 3175 3180
 Asn Val Tyr Asp Thr Gly Arg Thr Gly Arg Ile Arg Val Leu Ser
 3185 3190 3195
 Phe Lys Thr Gly Ile Ile Ser Leu Cys Lys Ala His Leu Glu Asp
 3200 3205 3210
 Lys Tyr Arg Tyr Leu Phe Lys Gln Val Ala Ser Ser Thr Gly Phe
 3215 3220 3225
 Cys Asp Gln Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu His Asp Ser Ile Gln
 3230 3235 3240
 Ile Pro Arg Gln Leu Gly Glu Val Ala Ser Phe Gly Gly Ser Asn
 3245 3250 3255
 Ile Glu Pro Ser Val Arg Ser Cys Phe Gln Phe Ala Asn Asn Lys
 3260 3265 3270
 Pro Glu Ile Glu Ala Ala Leu Phe Leu Asp Trp Met Arg Leu Glu
 3275 3280 3285
 Pro Gln Ser Met Val Trp Leu Pro Val Leu His Arg Val Ala Ala
 3290 3295 3300
 Ala Glu Thr Ala Lys His Gln Ala Lys Cys Asn Ile Cys Lys Glu
 3305 3310 3315
 Cys Pro Ile Ile Gly Phe Arg Tyr Arg Ser Leu Lys His Phe Asn
 3320 3325 3330
 Tyr Asp Ile Cys Gln Ser Cys Phe Phe Ser Gly Arg Val Ala Lys
 3335 3340 3345
 Gly His Lys Met His Tyr Pro Met Val Glu Tyr Cys Thr Pro Thr
 3350 3355 3360
 Thr Ser Gly Glu Asp Val Arg Asp Phe Ala Lys Val Leu Lys Asn
 3365 3370 3375
 Lys Phe Arg Thr Lys Arg Tyr Phe Ala Lys His Pro Arg Met Gly
 3380 3385 3390
 Tyr Leu Pro Val Gln Thr Val Leu Glu Gly Asp Asn Met Glu Thr
 3395 3400 3405
 Pro Val Thr Leu Ile Asn Phe Trp Pro Val Asp Ser Ala Pro Ala
 3410 3415 3420
 Ser Ser Pro Gln Leu Ser His Asp Asp Thr His Ser Arg Ile Glu
 3425 3430 3435
 His Tyr Ala Ser Arg Leu Ala Glu Met Glu Asn Ser Asn Gly Ser
 3440 3445 3450
 Tyr Leu Asn Asp Ser Ile Ser Pro Asn Glu Ser Ile Asp Asp Glu
 3455 3460 3465

ES 2 578 993 T3

His Leu Leu Ile Gln His Tyr Cys Gln Ser Leu Asn Gln Asp Ser
 3470 3475 3480
 Pro Leu Ser Gln Pro Arg Ser Pro Ala Gln Ile Leu Ile Ser Leu
 3485 3490 3495
 Glu Ser Glu Glu Arg Gly Glu Leu Glu Arg Ile Leu Ala Asp Leu
 3500 3505 3510
 Glu Glu Glu Asn Arg Asn Leu Gln Ala Glu Tyr Asp Arg Leu Lys
 3515 3520 3525
 Gln Gln His Glu His Lys Gly Leu Ser Pro Leu Pro Ser Pro Pro
 3530 3535 3540
 Glu Met Met Pro Thr Ser Pro Gln Ser Pro Arg Asp Ala Glu Leu
 3545 3550 3555
 Ile Ala Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln His Lys Gly Arg Leu Glu
 3560 3565 3570
 Ala Arg Met Gln Ile Leu Glu Asp His Asn Lys Gln Leu Glu Ser
 3575 3580 3585
 Gln Leu His Arg Leu Arg Gln Leu Leu Glu Gln Pro Gln Ala Glu
 3590 3595 3600
 Ala Lys Val Asn Gly Thr Thr Val Ser Ser Pro Ser Thr Ser Leu
 3605 3610 3615
 Gln Arg Ser Asp Ser Ser Gln Pro Met Leu Leu Arg Val Val Gly
 3620 3625 3630
 Ser Gln Thr Ser Asp Ser Met Gly Glu Glu Asp Leu Leu Ser Pro
 3635 3640 3645
 Pro Gln Asp Thr Ser Thr Gly Leu Glu Glu Val Met Glu Gln Leu
 3650 3655 3660
 Asn Asn Ser Phe Pro Ser Ser Arg Gly Arg Asn Thr Pro Gly Lys
 3665 3670 3675
 Pro Met Arg Glu Asp Thr Met
 3680 3685

<210> 7

<211> 13857

5 <212> ADN

<213> mus musculus

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Secuencia de ARNm del transcrito del gen DMD de la distrofina murina

<400> 7

atcagttact atgttgactc actcagtggtt gggctcactc acttgcccct tacaggactc 60
 agctcttgaa ggcaatagcc tttatagaaa aaacgaatag gaagacttga agtgctattt 120
 ttttttttgt caaggctgct gaagtttatt ggcttctcat cgtacctaag cctcctggag 180
 caataaaact gggagaaaact tttaccaaga tttttatccc tgccttgata tataactttt 240

ES 2 578 993 T3

cttccaaatg ctttgggtggg aagaagtaga ggactgttat gaaagagaag atgttcaaaa 300
 gaaaacattc acaaaatgga taaatgcaca attttctaag tttggaaagc aacacataga 360
 caacctcttc agtgacctgc aggatggaaa acgcctccta gacctcttgg aaggccttac 420
 agggcaaaaa ctgccaaaag aaaagggatc tacaagagtt catgccctga acaatgtcaa 480
 caaggcactg cgggtcttac agaaaaataa tgttgattta gtgaatatag gaagcactga 540
 catagtggat ggaaatcata aactcactct tggtttgatt tggaatataa tcctccactg 600
 gcaggtcaaa aatgtgatga aaactatcat ggctggattg cagcaaacca acagtgaaaa 660
 gattcttctg agctgggttc gacagtcaac acgtaattat ccacaggtta acgtcatcaa 720
 cttcacctct agctgggtccg acggggtggc tttgaatgct cttatccata gtcacaggcc 780
 cgacctgttt gattggaata gtgtggtttc acagcactca gccacccaaa gactggaaca 840
 tgcoctcaac attgcaaaat gccagttagg catagaaaaa cttcttgatc ctgaagatgt 900
 tgctaccact tatccagaca agaagtccat ctaaatgtac atcacatcac tctttcaagt 960
 tttgccacaa caagtgagca ttgaagccat tcaagaagtg gaaatggtgc ccaggacatc 1020
 ttcaaaagta actagagaag aacattttca attacatcac cagatgcatt actctcaaca 1080
 gatcacagtc agtctagcac agggctatga acaaacttct tcatctccta agcctogatt 1140
 caagagttat gccttcacac aggctgctta tgttgccacc tctgattcca cacagagccc 1200
 ctatccttca cagcatttgg aagctcccag agacaagtca cttgacagtt cattgatgga 1260
 gacggaagta aatctggata gttaccaaac tgctttagaa gaagtacttt catggcttct 1320
 ttctgcogag gatacattgc gagcacaagg agagatttca aatgatgttg aagaagtgaa 1380
 agaacagttt catgctcatg agggattcat gatggatctg acatctcatc aaggacttgt 1440
 tgqtaatggt ctacagttag gaagtcaact agttggaaaa gggaaattat cagaagatga 1500
 agaagctgaa gtgcaagaac aaatgaatct cctaaattca agatgggaat gtctcagggt 1560
 agctagcatg gaaaaacaaa gcaaattaca caaagtctta atggatctcc agaatcagaa 1620
 attaaaagaa ctagatgact ggtaacaaa aactgaagag agaactaaga aaatggagga 1680
 agagcccttt ggacctgatc ttgaagatct aaaatgcaa gtacaacaac ataagtgct 1740
 tcaagaagat ctagaacagg agcaggctag ggtcaactcg ctactcaca tggtagtagt 1800
 ggttgatgaa tccagcggtg atcatgcaac agctgctttg gaagaacaac ttaagg tact 1860
 gggagatcga tgggcaaata tctgcagatg gactgaagac cgctggattg ttttacaaga 1920
 tattcttcta aaatggcagc attttactga agaacagtgc ctttttagta catggctttc 1980
 agaaaaagaa gatgcaatga agaacattca gacaagtggc tttaaagatc aaaatgaaat 2040
 gatgtcaagt cttcacaaaa tatctacttt aaaaatagat ctagaaaaga aaaagccaac 2100
 catggaaaaa ctaagttcac tcaatcaaga tctactttcg gcactgaaaa ataagtcagt 2160

ES 2 578 993 T3

gactcaaaag atggaaatct ggatggaaaa ctttgcacaa cgttgggaca atttaaccca 2220
aaaacttgaa aagagttcag cacaaatttc acaggtgtc accaccactc aaccatccct 2280
aacacagaca actgtaatgg aaacggtaac tatggtgacc acaagggAAC aaatcatggt 2340
aaaacatgcc caagaggaac ttccaccacc acctcctcaa aagaagaggc agataactgt 2400
ggattctgaa ctcaggaaaa ggttggatgt cgatataact gaacttcaca gttggattac 2460
tcgttcagaa gctgtattac agagttctga atttgcagtc tatcgaaaag aaggcaacat 2520
ctcagacttg caagaaaaag tcaatgccat agcacgagaa aaagcagaga agttcagaaa 2580
actgcaagat gccagcagat cagctcaggc cctggtggaa cagatggcaa atgaggggtgt 2640
taatgctgaa agtatcagac aagcttcaga acaactgaac agccgggtgga cagaattctg 2700
ccaattgctg agtgagagag ttaactggct agagtatcaa accaacatca ttacctttta 2760
taatcagcta caacaattgg aacagatgac aactactgcc gaaaacttgt tgaaaacca 2820
gtctaccacc ctatcagagc caacagcaat taaaagccag ttaaaaattt gtaaggatga 2880
agtcaacaga ttgtcagetc ttcagcctca aattgagcaa ttaaaaattc agagtctaca 2940
actgaaagaa aagggacagc ggccaatggt tctggatgca gactttgtgg cctttactaa 3000
tcattttaac cacatctttg atggtgtgag ggccaaagag aaagagctac agacaatttt 3060
tgacacttta ccaccaatgc gctatcagga gacaatgagt agcatcagga cgtggatcca 3120
gcagtcagaa agcaaaactct ctgtacctta tcttagtggt actgaatatg aaataatgga 3180
ggagagactc gggaaattac aggctctgca aagttctttg aaagagcaac aaaatggctt 3240
caactatctg agtgacactg tgaaggagat ggccaagaaa gcaccttcag aaatatgcca 3300
gaaatatctg tcagaatttg aagagattga ggggactgg aagaaacttt cctcccagtt 3360
ggtggaaaagc tgccaaaagc tagaagaaca tatgaataaa cttcgaaaat ttcagaatca 3420
cataaaaacc ttacagaaat ggatggctga agttgatggt ttctgaaag aggaatggcc 3480
tgcoctgggg gatgctgaaa tctgaaaaa acagctcaaa caatgcagac ttttagttgg 3540
tgatattcaa acaattcagc ccagtttaa tagtgttaat gaaggtgggc agaagataaa 3600
gagtgaagct gaacttgagt ttgcatccag actggagaca gaacttagag agcttaacac 3660
tcagtgggat cacatatgcc gccaggctca caccagaaag gaagccttaa aggcaggttt 3720
ggataaaaacc gtaagcctcc aaaaagatct atcagagatg catgagtgga tgacacaagc 3780
tgaagaagaa tatctagaga gagattttga atataaaact ccagatgaat tacagactgc 3840
tgttgaagaa atgaagagag ctaaagaaga ggcactaca aaagaaacta aagtgaaact 3900
ccttactgag actgtaaata gtgtaatagc tcacgctcca ccctcagcac aagaggcctt 3960
aaaaaaggaa cttgaaactc tgaccaccaa ctaccaatgg ctgtgcacca ggctgaatgg 4020
aaaatgcaaa actttggaag aagtttgggc atggtggcat gagttattgt catatttga 4080
gaaagcaaac aagtggctca atgaagtaga attgaaactt aaaaccatgg aaaatgttcc 4140

ES 2 578 993 T3

tgcaggacct gaggaaatca ctgaagtgct agaatctctt gaaaatctga tgcattcattc 4200
 agaggagaac ccaaatacaga ttcgtctatt ggcacagact cttacagatg gaggagtcatt 4260
 ggatgaactg atcaatgagg agcttgagac gtttaattct cgttgaggag aactacatga 4320
 agaggctgtg aggaaacaaa agttgcttga acagagtatc cagtctgccc aggaaattga 4380
 aaagtccttg cacttaattc aggagtcgct tgaattcatt gacaagcagt tggcagctta 4440
 tatcactgac aaggtggatg cagctcaaat gcctcaggaa gccagaaaa tccaatacaga 4500
 tttgacaagt catgagataa gtttagaaga aatgaagaaa cataaccagg ggaaggatgc 4560
 caaccaaagg gttctttcac aaattgatgt tgcacagaaa aaattacaag atgtctccat 4620
 gaaatttcga ttattccaaa aaccagccaa ttttgaacaa cgtctagagg aaagtaagat 4680
 gatttttagat gaagtcaaga tgcatttgcc tgcattggaa accaagagtg ttgaacagga 4740
 agtaattcag tcacaactaa gtcattgtgt gaacttgtat aaaagcctga gtgaagtcaa 4800
 gtctgaagtg gaaatggtga ttaaaaccgg acgtcaaatt gtacagaaaa agcagacaga 4860
 aatcccaaaa gagcttgatg aacgagtaac agctttgaaa ttgcattaca atgagttggg 4920
 tgcgaaggta acagagagaa agcaacagtt ggagaaatgc ttgaagttgt cccgtaagat 4980
 gagaaaggaa atgaatgtct taacagaatg gctggcagca acagatacag aattgacgaa 5040
 gagatcagca gttgaaggaa tgccaagtaa tttggattct gaagttgcct ggggaaaggc 5100
 tactcaaaaa gagattgaga aacagaaggc tcaactgaag agtgttacag aattaggaga 5160
 gtctttgaaa atgggtgttg gcaagaaaga aacottggta gaagataaac tgagtcttct 5220
 gaacagtaac tggatagctg tcacctccag agtagaagaa tggctaaatc ttttgttgg 5280
 ataccagaaa cacatggaaa cctttgatca gaacatagaa caaatcaca agtgatcat 5340
 tcatgcagat gaacttttag atgagtctga aaagaagaaa ccacaacaaa aggaagacat 5400
 tottaagcgt ttaaaggctg aaatgaatga catgcgcca aaggtggact ccacacgtga 5460
 ccaagcagca aaattgatgg caaaccggg tgaccactgc aggaaagtag tagagccca 5520
 aatctctgag ctcaaccgtc gatttgcagc tatttctcac agaattaaga ctggaaaggc 5580
 ctccattcct ttgaaggaat tggagcagtt taactcagat atacaaaaat tgcttgaacc 5640
 actggaggct gaaattcagc aggggtgaa tctgaaagag gaagacttca ataaagatat 5700
 gagtgaagac aatgagggtg ctgtaaatga attgttgcaa agaggagaca acttacaaca 5760
 aagaatcaca gatgagagaa agcgagagga aataaagata aaacagcagc tgttacagac 5820
 aaaacataat gctctcaagg atttgaggtc tcaaagaaga aaaaaggccc tagaaatttc 5880
 tcaccagtgg tatcagtaca agaggcaggc tgatgatctc ctgaaatgct tggatgaaat 5940
 tgaaaaaaaa ttagccagcc tacctgaacc cagagatgaa agaaaattaa aggaaattga 6000
 tcgtgaattg cagaagaaga aagaggagct gaatgcagtg cgcaggcaag ctgagggctt 6060

ES 2 578 993 T3

gtctgagaat ggggccgcaa tggcagtgga gccaaactcag atccagctca gcaagcgctg 6120
 gcgggcaaatt gagagcaatt ttgctcagtt tcgaagactc aactttgcac aaattcacac 6180
 tctocatgaa gaaactatgg tagtgacgac tgaagatatg cctttggatg tttcttatgt 6240
 gccttctact tatttgaccg agatcagtcata tatcttataca gctctttcag aagttgatca 6300
 tcttctaaat actcctgaac tctgtgctaa agattttgaa gatcttttta agcaagagga 6360
 gtctcttaag aatataaaag acaatttgca acaaactctca ggtcggattg atattattca 6420
 caagaagaag acagcagcct tgcaaagtgc cacctccatg gaaaaggatg aagtacagga 6480
 agccgtggca cagatggatt tccaggggga aaaacttcat agaattgaca aggaacgaca 6540
 agggcgattc gacagatcag ttgaaaaatg gcgacacttt cattatgata tgaaggtatt 6600
 taatcaatgg ctgaatgaag ttgaaacagtt tttcaaaaag acacaaaatc ctgaaaactg 6660
 ggaacatgct aaatacaaat ggtatcttaa ggaactccag gatggcattg ggacagctca 6720
 agctgttgtc agaaactga atgcaactgg ggaagaaata attcaacagt cttcaaaaac 6780
 agatgtcaat attctacaag aaaaattagg aagcttgagt ctgcggtggc acgacatctg 6840
 caaagagctg gcagaaagga gaaagaggat tgaagaacaa aagaatgtct tgtcagaatt 6900
 tcaaagagat taaatgaat ttgttttgtg gctggaagaa gcagataaca ttgctattac 6960
 tccacttggga gatgagcagc agctaaaaga acaacttgaa caagtcaagt tactggcaga 7020
 agagttgccc ctgcgccagg gaattctaaa acaattaaat gaaacaggag gagcagtact 7080
 tgtaagtgct cccataaggc cagaagagca agataaactt gaaaagaagc tcaaacagac 7140
 aatctccag tggataaagg tctccagagc tttacctgag aaacaaggag agcttgaggt 7200
 tcaacttaaaa gatthtaggc agcttgaaga gcagctggat cacctgcttc tgtggctctc 7260
 tcctattaga aaccagttgg aaatttataa ccaaccaagt caggcaggac cgtttgacat 7320
 aaaggagatt gaagtaacag ttcacggtaa acaagcggat gtggaaaggc ttttgcgaa 7380
 agggcagcat ttgtataagg aaaaaccaag cactcagcca gtgaagagga agttagaaga 7440
 tctgaggtct gagtgggagg ctgtaaacca tttacttcgg gagctgagga caaagcagcc 7500
 tgaccgtgcc cctggactga gcactactgg agcctotgcc agtcagactg ttactctagt 7560
 gacacaatct gtggttacta aggaaaactgt catctccaaa ctagaaatgc catcttcttt 7620
 gctgttgagg gtacctgcac tggcagactt caaccgagct tggacagaac ttacagactg 7680
 gctgtctctg cttgatcgag ttataaaatc acagagagtg atggtgggtg atctggaaga 7740
 catcaatgaa atgatcatca aacagaaggc aacactgcaa gatttggaac agagacgccc 7800
 ccaattggaa gaactcatta ctgctgccca gaatttgaaa aacaaaacca gcaatcaaga 7860
 agctagaaca atcattactg atcgaattga aagaattcag atcagtgagg atgaggttca 7920
 agaacagctg cagaacagga gacaacagtt gaatgaaatg ttaaaggatt caacacaatg 7980
 gctggaagct aaggaagaag ccgaacaggt cataggacag gtcagaggca agcttgactc 8040

ES 2 578 993 T3

atggaaagaa ggtcctcaca cagtagatgc aatccaaaag aagatcacag aaaccaagca 8100
gttggccaaa gacctccgtc aacggcagat aagtgtagac gtggcaaagc atttggcact 8160
gaaacttctt cgggactatt ctgctgatga taccagaaaa gtacacatga taacagagaa 8220
tatcaatact tcttggggaa acattcataa aagagtaagt gagcaagagg ctgctttgga 8280
agaaactcat agattactgc agcagttccc tctggacctg gagaagtttc tttcctggat 8340
tacggaagca gaaacaactg ccaatgtcct acaggacgct tcccgttaagg agaagctcct 8400
agaagactcc aggggagtca gagagctgat gaaaccatgg caagatctcc aaggagaaat 8460
tgaaactcac acagatatct atcacaatct tgatgaaaat ggccaaaaaa tcctgagatc 8520
cctggaaggt tcggatgaag caccctgtt acaaagacgt ttggataaca tgaatttcaa 8580
gtggagtga cttcagaaaa agtctctcaa cattaggtcc catttggag caagttctga 8640
ccagtggaag cgtttgcac tttctctca ggaacttctt gtttggctac agctgaaaga 8700
tgatgaactg agccgtcagg caccatcgg tggtgatttc ccagcagttc agaagcagaa 8760
tgatatacat agggccttca agaggaatt gaaaactaaa gaacctgtaa tcatgagtac 8820
tctggagact gtgagaatat ttctgacaga gcagcctttg gaaggactag agaaactcta 8880
ccaggagccc agagaactgc ctctgaaga aagagctcag aatgtcactc ggctcctacg 8940
aaagcaggct gaagaggtca acgctgaatg ggacaaattg aacctgcgct cagctgattg 9000
gcagagaaaa atagatgaag ctcttgaaag actccaggaa cttcaggaag ctgccgatga 9060
actggacctc aagttgcgcc aagctgaggt gatcaagga tcctggcagc cagtggggga 9120
tctcctcatt gactctctgc aagatcacct tgaaaaagtc aaggcacttc ggggagaaat 9180
tgcaacctct aaagagaatg tcaatcgtgt caatgacctt gcacatcagc tgaccacact 9240
gggcattcag ctctcacctt ataacctcag cactttggaa gatctgaata ccagatggag 9300
gcttctacag gtggctgtgg aggacctgt cagacagctg catgaagccc acagggactt 9360
tggtcctgca tcccagcact tcctttccac ttcagttcag ggtccctggg agagagccat 9420
ctcaccaaac aaagtgcctt actatatcaa ccacgagacc caaaccactt gttgggacca 9480
ccccaaaatg acagagctct accagttctt agctgacctg aataatgtca ggttctccgc 9540
gtataggact gccatgaagc tcagaaggct ccagaaggcc ctttgcttgg atctcttgag 9600
cctgtcagct gcatgtgatg ccctggacca gcacaacctc aagcaaatg accagcccat 9660
ggatatcctg cagataatta actgtttgac tacaatttat gatcgtctgg agcaagagca 9720
caacaatctg gtcaatgtcc ctctctgtgt ggatatgtgt ctcaactggc ttctcaatgt 9780
ttatgatacg ggacgaacag ggaggatccg tgtcctgtct tttaaaactg gcatcatttc 9840
tctgtgtaaa gcacacttgg aagacaagta cagatacctt ttcaagcaag tggcaagttc 9900
aactggcttt tgtgaccagc gtaggctggg tcttctctct catgattcta ttcaaatccc 9960

ES 2 578 993 T3

aagacagttg ggtgaagttg cttcctttgg gggcagtaac attgagccga gtgtcaggag 10020
ctgcttccaa tttgccaata ataaacctga gattgaagct gctctcttcc ttgactggat 10080
gcgcttgaa cccagctcta tgggtgtggct gcccgctctg cacagagtgg ctgctgctga 10140
aactgccaaag catcaagcca agtgtaacat ctgtaaggag tgtccaatca ttggattcag 10200
gtacagaagc ctaaagcatt ttaattatga catctgccaa agttgctttt tttctggccg 10260
agttgcaaag ggccataaaa tgcactacc ccatgtagag tattgcactc cgactacatc 10320
cggagaagat gttcgcgact tcgccaaagg actaaaaaac aaatttcgaa ccaaaaggta 10380
ttttgcaag catccccgaa tgggctacct gccagtgcag actgtgttag agggggacaa 10440
catggaaact cccgttactc tgatcaactt ctggccagta gattctgcgc ctgcctcgtc 10500
ccccagctt tcacacgatg atactcattc acgcattgaa cattatgcta gcaggctagc 10560
agaaatggaa aacagcaatg gatcttatct aatgatagc atctctccta atgagagcat 10620
agatgatgaa catttgtaa tccagcatta ctgccaaagt ttgaaccagg actccccct 10680
gagccagcct cgtagtcctg cccagatctt gatttcctta gagagtgagg aaagagggga 10740
gctagagaga atcctagcag atcttgagga agaaaacagg aatctgcaag cagaatatga 10800
tcgcctgaag cagcagcatg agcataaagg cctgtctcca ctgccatctc ctctgagat 10860
gatgccacc tctcctcaga gtcccaggga tgctgagctc attgctgagg ctaagctact 10920
gcgccaacac aaaggacgcc tggaagccag gatgcaaatc ctggaagacc acaataaaca 10980
gctggagtct cagttacata gactgagaca gctcctggag cagccccagg ctgaagctaa 11040
ggtgaatggc accacggtgt cctctcctc cacctctctg cagaggtcag atagcagtca 11100
gcctatgctg ctccgagtgg ttggcagtca aacttcagaa tctatgggtg aggaagatct 11160
tctgagtcct cccagagaca caagcacagg gttagaagaa gtgatggagc aactcaaca 11220
ctccttcctt agttcaagag gaagaaatgc ccccgaaaag ccaatgagag aggacacaat 11280
gtaggaagcc ttttccacat ggcagatgat ttgggcagag cgatggagtc cttagtcca 11340
gtcatgacag atgaagaagg agcagaataa atgttttaca actcctgatt cccgcatggt 11400
ttttataata ttcgtacaac aaagaggatt agacagtaag agtttacaag aaataaaatc 11460
tatatTTTTg tgaagggtag tggtaactata ctgtagattt cagtagtttc taagtctgtt 11520
attgttttgt taacaatggc aggttttaca cgtctatgca attgtacaaa aaagttaaaa 11580
gaaaacatgt aaaatcttga tagctaaata acttgccatt tctttatatg gaacgcattt 11640
tgggttgttt aaaaatttat aacagttata aagaaagatt gtaaactaaa gtgtgcttta 11700
taaaaaaagt tgtttataaa aaccctaaa caaacacaca cgcacacaca cacacacaca 11760
cacacacaca cacacacgca cacatacatg cacgaacca ccacacacac acacacacac 11820
acacacactg aggcagcaca ttgttttgca ttacttttagc gtggatttca tatggaattc 11880
atgacgtttt tttatTTTct tgcatacga cccacccaaa tgactgcttc atattgctct 11940

ES 2 578 993 T3

tttgagaatt gttgactgag tggggctggc tatgggcttt cattttatac atctatatgt 12000
 ctacaagtat ataaatacta taggtatata gataaataga tatgaagtta cttcttcaaa 12060
 tgttcttgcc acttcctaata ggaaattgct tctagtcac tgggcttatac tgcttgggca 12120
 agagtgaatt ttccctggag cccaaagcca ggagactacc gccacactaa aatattgtct 12180
 agggctccag atgtttctag ttttaaactt tccactgaga gctagaggat tcattttttt 12240
 caaggaacat gcgaatgaat acacaggact tactatcata gtaatttggt ggctgatata 12300
 ttcaacttcc tactgttggg ttatatttaa tgatgtttct gcaatagaac atcagatgac 12360
 atttttaact ccagacagat aggaggaaga tggtaggagc taaaggttgc ggctcctcag 12420
 tcaatttata tgaggggagc aacaactctg taaaagaatg gatgaatatt tacaactata 12480
 catataaaca tctctataat tacaactaaa ttgttctgcc ctcttcataa actcaacctg 12540
 aagtgggtgg ttttgttgtt gttgttgttg ttgttgttga tgatgatgat gaattttaga 12600
 ttttagattt tttgggtttt tttttcttca ttgtgatgat tttttttttt aatgctgcaa 12660
 gacttaggat tactgttaag aaagtaacct aatcacattg tgaccctggt gaatatcagt 12720
 ccagaagccc atgaactgca tttgtctcct ttgcattggt ttccctgcaa gtaactccac 12780
 acaggattgt gggtgagaag gcacagtggg tggaaagtgt tgagagcaaa agcgtctcca 12840
 aactctctgg tctagttgac gggctgaaat gtctaaacaa atgcaagtca ttgaaccagg 12900
 agaaaaagtg caacagaaag ctaaggactg ctaggaagag ctttactcct ctcatgccag 12960
 tttcttcttc ttagcattta aagagcattc tctcaataga aatcactgtc ctatcatttt 13020
 gcaaatctgt tacctctaac gtcaagtgtg attaacttct agcgagtggg ttttgtccat 13080
 tattaattgt aattaacatc aaacacagct tctcatgcta tttctacctc actttggttt 13140
 tggggtggtt ctagtaattg tgcacaccta atttcacaac ttcaccactt gtctgttgtg 13200
 tggacaccag tttccttttt tcatttataa tttccaaaag aaaaccctaaa gctctaagat 13260
 aacaaattga aatttggttc tggctctgct ttctctctct ctctctcctt tatgtggcac 13320
 tgggcatttt ctttatccaa ggatttggtt tcaccaagat ttaaaacaag gggttccttt 13380
 cctactaaga agttttaagt ttcattctaa aatccaaggt agatagagtg catagttttg 13440
 ttttaatctt ttcgttttat cttttagata ttagttctgg agtgaatcta tcaaaatatt 13500
 tgaataaaaa ctgagagctt tattgctgat tttaagcata atttgacat catttcatgt 13560
 tctttataac catcaagtat taaagtgtaa atcataatca gtgtaactga agcataatca 13620
 tcacatggca tgtatcatca ttgtctccag gtactggact cttacttgag tatkataata 13680
 gattgtggtt taacaccaac actgtaacat ttactaatta tttttttaa cttcagtttt 13740
 actgcatttt cacaacatat cagatttcac caaatatatg ccttactatt gtattatatt 13800
 actgctttac tgtgtatctc aataaagcac gcagttatgt tacaaaaaaa taaaaaa 13857

<210> 8
 <211> 213
 <212> ADN

ES 2 578 993 T3

<213> mus musculus

<220>

<221> misc_feature

5 <223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina murina, exón 23

<400> 8

```

gctctgcaaa gttctttgaa agagcaacaa aatggcttca actatctgag tgacactgtg      60
aaggagatgg ccaagaaagc accttcagaa atatgccaga aatatctgtc agaatttgaa      120
gagattgagg ggcactggaa gaaactttcc tcccagttgg tggaaagctg ccaaaagcta      180
gaagaacata tgaataaact tcgaaaattt cag                                     213

```

10

<210> 9

<211> 213

<212> ADN

<213> mus musculus

15

<220>

<221> misc_feature

<223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina mutado del ratón mdx, exón 23

20

<400> 9

```

gctctgcaaa gttctttgaa agagcaataa aatggcttca actatctgag tgacactgtg      60
aaggagatgg ccaagaaagc accttcagaa atatgccaga aatatctgtc agaatttgaa      120
gagattgagg ggcactggaa gaaactttcc tcccagttgg tggaaagctg ccaaaagcta      180
gaagaacata tgaataaact tcgaaaattt cag                                     213

```

25

<210> 10

<211> 114

<212> ADN

<213> mus musculus

<220>

30 <221> misc_feature

<223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina murina, exón 24

<400> 10

```

aatcacataa aaaccttaca gaaatggatg gctgaagttg atgttttcct gaaagaggaa      60
tggcctgccc tgggggatgc tgaaatcctg aaaaaacagc tcaaacaatg caga          114

```

35

<210> 11

<211> 913

<212> ADN

40 <213> mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina murina, intrón 22

45

<400> 11

ES 2 578 993 T3

gtctgtggac atttgaatat cataaataac aaagaacatg tcttatcagt caagagatca 60
tattgatata ttaaacttaa ggtaataatg aaaaagtaaa gataataatg aaaaatcata 120
gattatgagt tggaaaaata aacagaacaa tttgaccaa aacatgactt tttcttattt 180
ttttctatat attattttat aaatatacag acataaatag atatatattt ttaaattaaa 240
agtactgtat taaaggaaag gtataatttc atttcatatt tagtgacata agatatgaag 300
tatgattatt aaaattaaat cacattattt tattataatt actttatttt taattcctaa 360
tttctttaag cttaggtaaa atcaatggat ttatataatt agttagaatt taaatattaa 420
caactataa cactatgatt aaatgcttga tattgagtag ttattttaat agcctaagtc 480
tggaaattaa atactagtaa gagaaacttc tgtgatgtga ggacatataa agactaattt 540
ttttgttgat tctaaaaatc ccatgttgta tacttattct ttttaaatct gaaaatatat 600
taatcatata ttgcctaaat gtcttaataa tgtttcactg taggtaagtt aaaatgtatc 660
acatatataa taaacatagt tattaatgca tagatattca gtaaaattat gacttctaaa 720
tttctgtcta aatataatat gccctgtaat ataatagaaa ttattcataa gaatacatat 780
atattgcttt atcagatatt ctactttggt tagatctcta aattacataa acttttattt 840
accttcttct tgatatgaat gaaactcatc aaatatgcgt gttagtgtaa atgaacttct 900
atttaatttt gag 913

<210> 12
<211> 2607
5 <212> ADN
<213> mus musculus

<220>
<221> misc_feature
10 <223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina murina, intrón 23

<400> 12
gtaagccgag gtttggcctt taaactatat tttttcacat agcaattaat tggaaaatgt 60
gatgggaaac agatatttta cccagagtc ccaagata ttgatgatat caaaagccaa 120
atctatttca aaggattgca acttgcctat ttttctatg aaaacagtaa tgtgtcatac 180
cttcttggat tgtctgtata aatgaattga ttttttttca ccaactcaa gtataacttaa 240
cattttaaca taataattta aaatatecctt attccattat gttcattttt taagttgtag 300
atatgattta gctcacagca tacatatata cacatgtatt acatatgcat atattatata 360
tatggcagac atatgttttc actaccatat ttcacttttg aattatgaat atatgtttaa 420
tttttgccat atttcttcc ctacattgac ttctattaat ttagtatttc agtagttcta 480
acacattaat aataacctag actcaataca gtaatctaac aattatattt gtgcctgtaa 540

ES 2 578 993 T3

ttctaagtta gttaaattca taggttgtgt ttctcatagt tggccatttg tgaaatataa 600
 taatatccga aaagaaagtt caaaaatgtc atgacttcat atagagttat tgaaacagtg 660
 cccttacttt cattctggcc atgctagtga cttgatcatt cttgtatfff acagctaaaa 720
 cactaccaa agtgtcaaat ccatgatcta catgtttgac tgaggctagc agcacttatt 780
 ccaccottat atgaagcett taagagaaag tataatgtgt tgctatffff aacttcttga 840
 aggaacatac aatcfffgtt tcaagagctc atcctctttc atgctagtaa atfffgggtgg 900
 cattgcatcc atgtctgact ctgaatctgt ttctgtctat cctgctccct aacactgtac 960
 catcttcttt tttgaaaaaa aaatattgaa ttatfffatt tatttacttt ccaaagttgc 1020
 tcctgctgt tctccttctt ccaagttctt cagtccccc tgctccccc cgatgagagg 1080
 gaaaggtcct gaattcactg ggctccatgg gggctctfff gcattfffctt aaccttctta 1140
 ataaaatagg ccttctagaa ttatatcata tacattgtga tatgacaaat gataaagtat 1200
 attgttcaga gttttacctt gttcatatff gcaatgtccc cctgtcatgc tggatattct 1260
 ttgattgggt atatffgcta acagattaag tataatfatc ttctgtaagc agtataactt 1320
 attaagaaag aactctatta atatgagaaa taactaatga aacaccactc cacaggtgat 1380
 ttcagccact ttatgaactg ctggaagcaa aatgagatc tttgcaacat gaagcagttg 1440
 ctcagttcat taaactgtgt tcaatatffc agccataaca tacattagag aatgattfat 1500
 attgttcaaa catttgggtc tctatfffgt catgacgtgg gattaaacac agcaccaaca 1560
 atcaacaat tgcaaagatg tattacaagt atfffcttct tttaaaacag gaaagtatac 1620
 ttatatfffcc attgtccaaa ccatcatgaa agggatagag attactgaca caaatttga 1680
 gaaaggattt gagtggagta agaattaaat gaaccaaaga agaattaaatg tattcatcaa 1740
 gaagtcatgg aggtgaaatt ggccttgaat gataccacta aggagagaat gttgagatcc 1800
 ttatatfftag tcaattgttt ttaaatctgt agttattaac cacatfftaa tcatattgaa 1860
 agggaaatff tctgtgatgc atgtatfffct aatataaatt ttagaaaaga agacaattat 1920
 aacttgattt tgtgaattac atggaactaa agaaatgaca gatttactt tgaaaattga 1980
 ctgaactaaa gtacataaat aaaagtcata cagaaaaatg tgggaggtgc ttgtccattt 2040
 ataaaggaca aaaatgccaat ttgttgccct atcattatff cttattggtc agaccaataa 2100
 gaaatcaaga gctffgactt taaaggtaag aaaatcttact cttaaaatcc ccaactgaag 2160
 ggactgtffa aactgtcaac tgcagaaaac aagttatgga agttcaggtt tagggaaact 2220
 ataaacacac cataacattg agtttatgtg catagttgtt tttatgtaca gtgagagtaa 2280
 attgttagta ttatcatgag ttgtfffgaa acttcaaatt tctctagagg ggtatgattt 2340
 aatgttctca agaggaacat aataaaacca tatctggtat tagttfffat ttttaacaat 2400
 agcagacttc atacaccaat gttcacagtg tagaccataa aatgcagtct tagtaaaaat 2460

ES 2 578 993 T3

attattctct ataaagctac aatgagacct ccctcaaca tacattgttt tttttttct 2520
aacttatgtt tggatatatc atcatgatga actatgttaa aaacaatcag agcttagtaa 2580
tactttcata ttgetttttt attccag 2607

<210> 13
<211> 150
5 <212> ADN
<213> artificial

<220>
<223> Secuencia antisentido SA1

10 <400> 13

cttcatatct tatgtcacta aatatgaaat gaaattatac ctttccttta atacagtact 60
tttaatttaa aaatatatat ctatttatgt ctgtatattt ataaaataat atatagaaaa 120
aaataagaaa aagtcatggt ttgggtcaaa 150

15 <210> 14
<211> 150
<212> ADN
<213> artificial

20 <220>
<223> Secuencia antisentido SA2

<400> 14

atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa 60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca 120
gacttaggct attaaaataa ctactcaata 150

25 <210> 15
<211> 150
<212> ADN
30 <213> artificial

<220>
<223> Secuencia antisentido SA3

35 <400> 15

aaatagaagt tcattttacac taacacgcat atttgatgag tttcattcat atcaagaaga 60
aggtaaataa aagtttatgt aatttagaga tctaaacaaa gtagaatatc tgataaagca 120
atatatatgt attcttatga ataatttcta 150

40 <210> 16
<211> 150
<212> ADN
<213> artificial

<220>
45 <223> Secuencia antisentido AS4

<400> 16

ttagttccat gtaattcaca aatcaagtt ataattgtct tcttttctaa aatttatatt 60

ES 2 578 993 T3

| | | |
|----|--|------------|
| | gaaaatacat gcatcacaga aaatttcctt ttcaatatga ttaaaatgtg gttaataact | 120 |
| | acagatttaa aaacaattga ctaaatataa | 150 |
| 5 | <210> 17 <211> 150 <212> ADN <213> artificial | |
| 10 | <220> <223> Secuencia antisentido AS5 <400> 17 | |
| | cacataaact caatgttatg gtgtgtttat agtttcctta aacctgaact tccataaact | 60 |
| | gttttctgca gttgacagtt taaacagtcc cttcagttgg ggattttaag gtaagatttt | 120 |
| | cttaaccttta aagtcaaagc tcttgatttc | 150 |
| 15 | <210> 18 <211> 150 <212> ADN <213> artificial | |
| 20 | <220> <223> Secuencia antisentido AS6 <400> 18 | |
| | tcatcatgat gatatatcca aacataagtt agaaaaaaaa aaacaatgta tgtttgaggg | 60 |
| | aggtctcatt gtagctttat agagaataat atttttacta agactgcatt ttatggtcta | 120 |
| 25 | cactgtgaac attggtgtat gaagtctgct | 150 |
| 30 | <210> 19 <211> 150 <212> ADN <213> artificial | |
| 35 | <220> <223> Secuencia antisentido AS7 <400> 19 | |
| | caagttgcaa tcctttgaaa tagatttggc ttttgatata atcaatatct ttgaaggact | 60 |
| | ctgggtaaaa tatctgtttc ccatcacatt ttccaattaa ttgctatgtg aaaaaatata | 120 |
| | gtttaaaggc caaacctogg cttacctgaa | 150 |
| 40 | <210> 20 <211> 150 <212> ADN <213> artificial | |
| 45 | <220> <223> Secuencia antisentido AS8 <400> 20 | |
| | ctacaactta aaaaatgaac ataatggaat aaggatattt taaattatta tgttaaaatg | 60 |
| | ttaagtatac ttggagtgg tgaaaaaaaa tcaattcatt tatacagaca atccaagaag | 120 |
| 50 | gtatgacaca ttactgtttt cataggaaaa | 150 |

ES 2 578 993 T3

5 <210> 21
 <211> 306
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia antisentido 2XAS4

10 <400> 21

```

ttagttccat gtaattcaca aaatcaagtt ataattgtct tcttttctaa aatttatatt    60
gaaaatacat gcatcacaga aaatttcctt ttcaatatga ttaaaatgtg gttaataact    120
acagatttaa aaacaattga ctaaataata gaattccttag ttccatgtaa ttcacaaaat    180
caagttataa ttgtcttctt ttctaaaatt tatattgaaa atacatgcat cacagaaaat    240
ttccctttca atatgattaa aatgtggtta ataactacag atttaaaaac aattgactaa    300
atataa                                           306
  
```

15 <210> 22
 <211> 2250
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de nucleótidos situada en la mitad 5' de la secuencia de nucleótidos del intrón 23

<400> 22

```

gtaagccgag gtttggcctt taaactatat tttttcacat agcaattaat tggaaaatgt    60
gatgggaaac agatatttta cccagagtc ccaagata ttgatgatat caaaagccaa    120
atctatttca aaggattgca acttgcttat ttttctatg aaaacagtaa tgtgtcatac    180
cttcttggat tgtctgtata aatgaattga ttttttttca ccaactccaa gtataacttaa    240
cattttaaca taataattta aaatatcctt attccattat gttcattttt taagttgtag    300
atatgattta gctcacagca tacatatata cacatgtatt acatatgcat atattatata    360
tatggcagac atatgttttc actaccatat ttcacttttg aattatgaat atatgtttaa    420
ttcttgccat atttccttcc ctacattgac ttctattaat ttagtatttc agtagttcta    480
acacattaat aataacctag actcaataca gtaatctaac aattatattt gtgcctgtaa    540
ttctaagtta gttaaattca taggttgtgt ttctcatagt tggccatttg tgaaatataa    600
taatatccga aaagaaagtt caaaaatgtc atgacttcat atagagttat tgaaacagtg    660
cccttacttt cattctggcc atgctagtga cttgatcatt cttgtatttt acagctaaaa    720
cactacaaa agtgtcaaat ccatgatcta catgtttgac tgaggctagc agcacttatt    780
ccacccttat atgaagcctt taagagaaag tatatttgtt tgctattttt aacttcttga    840
  
```

ES 2 578 993 T3

aggaacatac aatctttggt tcaagagctc atcctctttc atgctagtaa attttgggtgg 900
 cattgcaccc atgtctgact ctgaatctgt ttctgtctat cctgctccct aacactgtac 960
 catcttcctt ttgaaaaaa aaatattgaa ttatthttatt tatttacttt ccaaagttgc 1020
 tcctgcctgt tcctccttct ccaagttctt cagteccccc tgctccccac cgatgagagg 1080
 gaaaggtcct gaattcactg ggctccatgg gggtcctttt gcattttctt aaccttctta 1140
 ataaaaatagg ccttctagaa ttatatcata tacattgtga tatgacaaat gataaagtat 1200
 attgttcaga gttttacctt gttcatattt gcaatgtccc cctgtcatgc tggatattct 1260
 ttgattgggt atatttgcta acagattaag tatattttatc ttcgttaagc agtataactt 1320
 attaagaaag aactctatta atatgagaaa taactaatga aacaccactc cacaggtgat 1380
 ttcagccact ttatgaactg ctggaagcaa aaatgagatc tttgcaacat gaagcagttg 1440
 ctcagttcat taaactgtgt tcaatatttc agccataaca tacattagag aatgatttat 1500
 attgttcaaa catttggtgc tctatthttg catgacgtgg gattaaacac agcaccaaca 1560
 atcaaacat tgcaaagatg tattacaagt atthtttctt tttaaaacag gaaagtatac 1620
 ttatatttcc attgtccaaa ccatcatgaa agggatagag attactgaca caaatttaga 1680
 gaaaggattt gagtggagta agaattaat gaaccaaaga agaattaatg tattcatcaa 1740
 gaagtcatgg aggtgaaatt ggccttgaat gataccacta aggagagaat gttgagatcc 1800
 ttatatttag tcaattgtht ttaaactctgt agttattaac cacattthta tcatattgaa 1860
 agggaaattt tctgtgatgc atgtatthtc aatataaatt ttagaaaaga agacaattat 1920
 aacttgattt tgtgaattac atggaactaa agaaatgaca gatttacatt tgaaaattga 1980
 ctgaaactaaa gtacataaat aaaagtcata cagaaaaatg tgggaggtgc ttgtccattt 2040
 ataaaggaca aaaatgccat ttgttgctta atcattattht cttattggtc agaccaataa 2100
 gaaatcaaga gctttgactt taaaggtaag aaaatcttac cttaaaatcc ccaactgaag 2160
 ggactgttta aactgtcaac tgcagaaaac aagttatgga agttcaggtt tagggaaact 2220
 ataaacacac cataacattg agtttatgtg 2250

<210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Espaciador 1 (extremo 3')

10

<400> 23

acagctcttt cttccatgg gttggcctga attc

34

15

<210> 24
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 578 993 T3

| | | | |
|----|--|--|----|
| | <220> | | |
| | <223> Espaciador 2 (extremo 5') | | |
| 5 | <400> 24 | | |
| | ctcgagagat ctccgcgga cattattata acgttgctcg aa | | 42 |
| | <210> 25 | | |
| 10 | <211> 7 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> artificial | | |
| | <220> | | |
| 15 | <223> Secuencia de punto de ramificación de levadura conservada | | |
| | <400> 25 | | |
| | tactaac | | 7 |
| 20 | <210> 26 | | |
| | <211> 30 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> artificial | | |
| 25 | <220> | | |
| | <223> Secuencia intrónica de intensificación de corte y empalme (IICE) | | |
| | <400> 26 | | |
| 30 | ggctgagggga aggactgtcc tggggactgg | | 30 |
| | <210> 27 | | |
| | <211> 24 | | |
| 35 | <212> ADN | | |
| | <213> artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Secuencia intrónica de intensificación de corte y empalme posterior (DISE) | | |
| 40 | <400> 27 | | |
| | ctcttcttt ccatgggttg gcct | | 24 |
| 45 | <210> 28 | | |
| | <211> 20 | | |
| | <212> ADN | | |
| | <213> artificial | | |
| 50 | <220> | | |
| | <223> Secuencia de tramo polipirimidina | | |
| | <400> 28 | | |
| 55 | tctcttcttt tttttttcc | | 20 |
| | <210> 29 | | |
| | <211> 9 | | |
| | <212> ADN | | |
| 60 | <213> artificial | | |
| | <220> | | |
| | <223> Sitio aceptor de corte y empalme 3' canónico | | |
| 65 | <400> 29 | | |

ES 2 578 993 T3

| | | |
|----|--|----|
| | ggaaaacag | 9 |
| | <210> 30 | |
| | <211> 6 | |
| 5 | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Sitio donante de corte y empalme 5' | |
| 10 | <400> 30 | |
| | gtaaga | 6 |
| 15 | <210> 31 | |
| | <211> 41 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| 20 | <220> | |
| | <223> Región de corte y empalme 3' del gen molécula pre-corte y empalme en trans | |
| | <400> 31 | |
| 25 | tactaactga tatctctct tttttttt ccgaaaaca g | 41 |
| | <210> 32 | |
| | <211> 19 | |
| | <212> ADN | |
| 30 | <213> artificial | |
| | <220> | |
| | <223> Cebador directo para E23 | |
| 35 | <400> 32 | |
| | agatggccaa gaaagcacc | 19 |
| 40 | <210> 33 | |
| | <211> 19 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| | <220> | |
| 45 | <223> Cebador inverso para E23 | |
| | <400> 33 | |
| 50 | ctttccacca actgggagg | 19 |
| | <210> 34 | |
| | <211> 23 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| 55 | <220> | |
| | <223> Cebador directo para E24 | |
| | <400> 34 | |
| 60 | tgaaaaaaca gctcaaaca tgc | 23 |
| | <210> 35 | |
| | <211> 19 | |
| 65 | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |

ES 2 578 993 T3

| | | |
|----|--|-----|
| | <220> | |
| | <223> Cebador inverso para E24 | |
| 5 | <400> 35 | |
| | agcatcccc agggcaggc | 19 |
| | <210> 36 | |
| 10 | <211> 21 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| | <220> | |
| 15 | <223> Cebador directo E22-F | |
| | <400> 36 | |
| | gacactttac caccaatgcg c | 21 |
| 20 | <210> 37 | |
| | <211> 20 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| 25 | <220> | |
| | <223> Cebador inverso pSMD2-R1 | |
| | <400> 37 | |
| 30 | ctttctgata ggcagcctgc | 20 |
| | <210> 38 | |
| | <211> 20 | |
| 35 | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| | <220> | |
| 40 | <223> Cebador pSMD2-R5 | |
| | <400> 38 | |
| | ctcacctga agttctcagg | 20 |
| 45 | <210> 39 | |
| | <211> 3996 | |
| | <212> ADN | |
| | <213> artificial | |
| 50 | <220> | |
| | <223> Diana minigén DMD murino que comprende los exones E22, E23 y E24 | |
| | <400> 39 | |
| | tttttgacac tttaccacca atgcgctatc aggagacaat gagtagcatc aggacgtgga | 60 |
| | tccagcagtc agaaagcaaaa ctctctgtac cttatcttag tgttactgaa tatgaaataa | 120 |
| | tggaggagag actcgggaaa ttacaggtct gtggacattt gaatatcata aataacaaag | 180 |
| | aacatgtctt atcagtcaag agatcatatt gatataataa acttaaggta ataataaaaa | 240 |
| 55 | agtaaagata ataataaaaa atcatagatt atgagttgga aaaataaaca gaacaatttg | 300 |

ES 2 578 993 T3

accaaaaaca tgactttttc ttattttttt ctatatatta ttttataaat atacagacat 360
 aaatagatat atatttttaa attaaaagta ctgtattaaa ggaaaggat aatttcattt 420
 catatttagt gacataagat atgaagtatg attattaaaa ttaaatcaca ttattttatt 480
 ataattactt tatttttaat ttoctaatttc ttttaagctta ggtaaaatca atggatttat 540
 ataattagtt agaattttaa tattaacaaa ctataacact atgattaaat gcttgatatt 600
 gagtagttat ttttaatagcc taagtctgga aattaaatc tagtaagaga aacttctgtg 660
 atgtgaggac atataaagac taattttttt gttgattcta aaaatcccat gttgtatact 720
 tattcttttt aaatctgaaa atatattaat catatatatgc ctaaagtctt taataatgtt 780
 tcaactgtagg taagttaaaa tgtatcacat atataataaa catagttatt aatgcataga 840
 tattcagtaa aattatgact tctaaatttc tgtctaaata taatatgcc tgtaataata 900
 tagaaattat tcataagaat acatatatat tgctttatca gatattctac tttgtttaga 960
 tctctaaatt acataaactt ttatttacct tcttcttgat atgaatgaaa ctcatcaaat 1020
 atgcgtgta gtgtaaatga acttctattt aattttgagg ctctgcaaag ttctttgaaa 1080
 gagcaataaa atggcttcaa ctatctgagt gacactgtga aggagatggc caagaaagca 1140
 ccttcagaaa tatgccagaa atatctgtca gaatttgaag agattgaggg gcaactggaag 1200
 aaactttcct ccagttggg ggaaagctgc caaaagctag aagaacatat gaataaactt 1260
 cgaaaatttc aggtaaagcc aggtttggcc tttaaactat attttttcac atagcaatta 1320
 attgaaaaat gtgatgggaa acagatattt taccagagt ccttcaaaga tattgatgat 1380
 atcaaaagcc aaatctattt caaaggattg caacttgcct atttttccta tgaaaacagt 1440
 aatgtgtcat accttctgg attgtctgta taaatgaatt gatttttttt caccaactcc 1500
 aagtatactt aacattttaa cataataatt taaaatatcc ttattccatt atgttcattt 1560
 ttttaagttgt agatatgatt tagctcacag catacatata tacacatgta ttacatatgc 1620
 atatattata tatatggcag acatatgttt tcaactacat atttcacttt tgaattatga 1680
 atatatgttt aatttctgcc atatttcctt ccctacattg acttctatta atttagtatt 1740
 tcagtagttc taacacatta ataataacct agactcaata cagtaatcta acaattatat 1800
 ttgtgcctgt aattctaagt tagttaaatt cataggttgt gtttctcata gttggcatt 1860
 tgtgaaatat aataatatcc gaaaagaaag ttcaaaaatg tcatgacttc atatagagtt 1920
 attgaaacag tgcccttact ttcattctgg ccatgctagt gacttgatca ttcttqtatt 1980
 ttacagctaa aacactacca aaagtgtcaa atccatgatc tacatgtttg actgaggcta 2040
 gcagcactta ttccaccctt atatgaagcc ttttaagagaa agtatatttg tttgctattt 2100
 ttaacttctt gaaggaacat acaatcttg tttcaagagc tcatocctct tcatgctagt 2160
 aaattttggg ggcattgcat ccagtctgta ctctgaatct gtttctgtct atcctgctcc 2220
 ctaacactgt accatcttcc tttttgaaaa aaaaatattg aattatttta tttatttact 2280

ES 2 578 993 T3

ttccaaagtt gctcctgect gttcctcctt ctccaagttc ttcagtcctc cctgctcccc 2340
 accgatgaga gggaaaggtc ctgaattcac tgggctccat gggggctcctt ttgcattttc 2400
 ttaaccttct taataaaata ggccttctag aattatatca tatacattgt gatatgacaa 2460
 atgataaagt atattgttca gagttttacc ttgttcatat ttgcaatgtc cccctgtcat 2520
 gctggatatt ctttgattgg gtatatttgc taacagatta agtatattta tcttcgtaa 2580
 gcagtataac ttattaagaa agaactctat taatatgaga aataactaat gaaacaccac 2640
 tccacagggtg atttcagcca ctttatgaac tgctggaagc aaaaatgaga tctttgcaac 2700
 atgaagcagt tgctcagttc attaaactgt gttcaatatt tcagccataa catacattag 2760
 agaatgattt atattgttca aacatttggg gctctatattt tgcattgacgt gggattaaac 2820
 acagcaccaa caatcaaaca attgcaaaga tgtattacaa gtattttttc tttttaaaac 2880
 aggaaagtat acttatattt ccattgtcca aaccatcatg aaagggatag agattactga 2940
 caciaattta gagaaaggat ttgagtggag taagaattaa atgaacccaa gaagaattaa 3000
 tgtattcatc aagaagtcac ggaggtgaaa ttggccttga atgataccac taaggagaga 3060
 atgttgagat ccttatattt agtcaattgt ttttaaactc gtagtatta accacatttt 3120
 aatcatattg aaagggaat tttctgtgat gcatgtattt tcaatataaa ttttagaaaa 3180
 gaagacaatt ataacttgat tttgtgaatt acatggaact aaagaaatga cagatttaca 3240
 tttgaaaatt gactgaacta aagtacataa ataaaagtca tacagaaaaa tgtgggaggt 3300
 gcttgtccat ttataaagga caaaaatgcc atttgttgcc taatcattat ttcttattgg 3360
 tcagaccaat aagaaatcaa gagctttgac tttaaaggta agaaaatcctt accttaaaat 3420
 cccaactga agggactgtt taaactgtca actgcagaaa acaagttatg gaagttcagg 3480
 tttagggaaa ctataaacac accataacat tgagtttatg tgcattgattt gttttatgta 3540
 cagtgagagt aaattgtag tattatcatg agttgttttg aaacttcaa tttctctaga 3600
 ggggtatgat ttaatgttct caagaggaac ataataaaac catatctggg attagttttt 3660
 atttttaaca atagcagact tcatacacca atgttcacag tgtagaccat aaaatgcagt 3720
 cttagtaaaa atattattct ctataaagct acaatgagac ctccctcaa catacattgt 3780
 tttttttttt ctaacttatg tttggatata tcatcatgat gaactatggt aaaaacaatc 3840
 agagcttagt aatactttca tattgctttt ttattccaga atcacataaa aaccttacag 3900
 aaatggatgg ctgaagttga tgttttcctg aaagaggaat ggcctgccct gggggatgct 3960
 gaaatcctga aaaaacagct caaacaatgc agataa 3996

<210> 40
 <211> 347
 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 578 993 T3

<220>

<223> Moléculas de CET AS1-E24

5 <400> 40

```
cttcatatct tatgtcacta aatatgaaat gaaattatac ctttccttta atacagtact 60
tttaatttaa aaatatatat ctatttatgt ctgtatattt ataaaataat atatagaaaa 120
aaataagaaa aagtcatggt ttgggtcaaa ctcgagagat ctccgcgga cattattata 180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcaga 347
```

<210> 41

10 <211> 347

<212> ADN

<213> artificial

<220>

15 <223> Moléculas de CET AS2-E24

<400> 41

```
atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gatttttaga atcaacaaaa 60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca 120
gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgcgga cattattata 180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcaga 347
```

<210> 42

20 <211> 347

<212> ADN

<213> artificial

<220>

25 <223> Moléculas de CET AS3-E24

<400> 42

30

```
aaatagaagt tcatttacac taacacgcat atttgatgag tttcattcat atcaagaaga 60
aggtaaataa aagtttatgt aatttagaga tctaaacaaa gtagaatatc tgataaagca 120
atatatatgt attccttatga ataatttcta ctcgagagat ctccgcgga cattattata 180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcaga 347
```

<210> 43

35 <211> 185

<212> ADN

ES 2 578 993 T3

<213> artificial

<220>

<223> Molécula de corte y empalme en trans sin dominio de unión (AS-)

5

<400> 43

```

ccgcggaaca ttattataac gttgctcgaa tactaactga tatctcttct tttttttttt    60
ccggaaaaca gaatcacata aaaaccttac agaaatggat ggctgaagtt gatgttttcc    120
tgaaagagga atggcctgcc ctgggggatg ctgaaatcct gaaaaaacag ctcaaacaat    180
gcaga                                             185
    
```

10

<210> 44

<211> 515

<212> ADN

<213> artificial

15

<220>

<223> molécula de CET AS1-E24-AS4

<400> 44

```

cttcatatct tatgtcacta aatatgaaat gaaattatac ctttccttta atacagtact    60
tttaatttaa aaatatatat ctatttatgt ctgtatattt ataaaataat atatagaaaa    120
aaataagaaa aagtcatggt ttgggtcaaa ctcgagagat ctccgcggaa cattattata    180
acgttgctcg aatactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca    240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg    300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg    360
aattcttagt tccatgtaat tcacaaaatc aagttataat tgtcttcttt tctaaaattt    420
atattgaaaa tacatgcatc acagaaaatt tcoccttcaa tatgattaaa atgtgggttaa    480
taactacaga tttaaaaaca attgactaaa tataa                                             515
    
```

20

<210> 45

<211> 515

<212> ADN

<213> artificial

25

<220>

<223> Molécula de CET AS1-E24-AS5

30

<400> 45

```

cttcatatct tatgtcacta aatatgaaat gaaattatac ctttccttta atacagtact    60
tttaatttaa aaatatatat ctatttatgt ctgtatattt ataaaataat atatagaaaa    120
aaataagaaa aagtcatggt ttgggtcaaa ctcgagagat ctccgcggaa cattattata    180
acgttgctcg aatactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca    240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg    300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg    360
aattccacat aaactcaatg ttatggtgtg tttatagttt ccctaaacct gaacttccat    420
    
```

ES 2 578 993 T3

aacttgtttt ctgcagttga cagtttaaac agtcccttca gttggggatt ttaaggtaag 480
 attttcttac ctttaaagtc aaagctcttg atttc 515

5 <210> 46
 <211> 515
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Molécula de CET AS1-E24-AS6

<400> 46
 cttcatatct tatgtcacta aatatgaaat gaaattatac ctttccttta atacagtact 60
 ttttaatttaa aaatatatat ctatttatgt ctgtatattt ataaaataat atatagaaaa 120
 aaataagaaa aagtcatggt tttgggtcaaa ctcgagagat ctccgcgaa cattattata 180
 acgttgctcg aatactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
 taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
 ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg 360
 aattctcatc atgatgatat atccaaacat aagttagaaa aaaaaaaaaa atgtatgttt 420
 gagggaggtc tcattgtagc tttatagaga ataatatttt tactaagact gcattttatg 480
 gtctacactg tgaacattgg tgtatgaagt ctgct 515

15 <210> 47
 <211> 515
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Molécula de CET AS1-E24-AS7

<400> 47
 cttcatatct tatgtcacta aatatgaaat gaaattatac ctttccttta atacagtact 60
 ttttaatttaa aaatatatat ctatttatgt ctgtatattt ataaaataat atatagaaaa 120
 aaataagaaa aagtcatggt tttgggtcaaa ctcgagagat ctccgcgaa cattattata 180
 acgttgctcg aatactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
 taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
 ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg 360
 aattccaagt tgcaatcctt tgaatatagat ttggcttttg atatcatcaa tatctttgaa 420
 ggactctggg taaaatatct gtttcccatc acattttcca attaattgct atgtgaaaaa 480
 25 atatagttaa aaggccaaac ctcggttac ctgaa 515

30 <210> 48
 <211> 515
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>

ES 2 578 993 T3

<223> Molécula de CET AS2-E24-AS4

<400> 48

```

atatatatttc agatttataaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa      60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca      120
gacttaggct attaaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgaggaa cattattata      180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca      240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg      300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg      360
aattcttagt tccatgtaat tcacaaaatc aagttataat tgtcttcttt tctaaaattt      420
atattgaaaa tacatgcatc acagaaaatt tccctttcaa tatgattaaa atgtgggtaa      480
5 taactacaga tttaaaaaca attgactaaa tataa                                     515

```

<210> 49

<211> 515

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> Molécula de CET AS2-E24-AS5

15 <400> 49

```

atatatatttc agatttataaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa      60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca      120
gacttaggct attaaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgaggaa cattattata      180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca      240
taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg      300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg      360
aattccacat aaactcaatg ttatggtgtg tttatagttt ccctaaacct gaacttccat      420
aacttgtttt ctgcagttga cagtttaaac agtcccttca gttggggatt ttaaggtaag      480
attttcttac ctttaaagtc aaagctcttg atttc                                     515

```

<210> 50

20 <211> 515

<212> ADN

<213> artificial

<220>

25 <223> Moléculas de CET AS2-E24-AS6

<400> 50

```

atatatatttc agatttataaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa      60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca      120

```

ES 2 578 993 T3

gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgcgga cattattata 180
 acgttgctcg aatactaact gatatactctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
 taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
 ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg 360
 aattctcacc atgatgatat atccaaacat aagttagaaa aaaaaaaca atgtatgttt 420
 gagggaggtc tcattgtagc tttatagaga ataatatattt tactaagact gcattttatg 480
 gtctacactg tgaacattgg tgtatgaagt ctgct 515

5 <210> 51
 <211> 515
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Molécula de CET AS2-E24-AS7

<400> 51
 atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa 60
 aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca 120
 gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgcgga cattattata 180
 acgttgctcg aatactaact gatatactctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
 taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
 ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg 360
 aattccaagt tgcaatcctt tgaatatagat ttggcttttg atatcatcaa tatctttgaa 420
 ggactctggg taaaatatct gtttcccatc acattttcca attaattgct atgtgaaaaa 480
 atatagttta aaggccaaac ctcggttac ctgaa 515

15 <210> 52
 <211> 515
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Molécula de CET AS2-E24-AS8

<400> 52
 atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa 60
 aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca 120
 gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgcgga cattattata 180
 acgttgctcg aatactaact gatatactctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
 taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
 ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg 360
 aattcctaca acttaaaaa tgaacataat ggaataagga tatttttaaat tattatgtta 420

25

ES 2 578 993 T3

aaatgttaag tataacttggg gttggtgaaa aaaaatcaat tcatttatac agacaatcca 480
 agaaggtatg acacattact gttttcatag gaaaa 515

5 <210> 53
 <211> 671
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> molécula de CET AS2-E24-2XAS4
 <400> 53

atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa 60
 aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca 120
 gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgaggaa cattattata 180
 acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
 taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
 ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaagatctg 360
 aattcttagt tccatgtaat tcacaaaatc aagtataat tgtcttcttt tctaaaattt 420
 atattgaaaa tacatgcatc acagaaaatt tccctttcaa tatgattaaa atgtggttaa 480
 taactacaga tttaaaaaca attgactaaa tataagaatt cttagttcca tgtaattcac 540
 aaaatcaagt tataattgtc ttcttttcta aaatttatat tgaaaataca tgcatcacag 600
 aaaatttccc tttcaatatg attaaaatgt ggtaataaac tacagattta aaaacaattg 660
 actaaatata a 671

15 <210> 54
 <211> 543
 <212> ADN
 <213> artificial

20 <220>
 <223> Molécula de CET AS2-E24-AS4 que comprende DISE
 <400> 54

atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa 60
 aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca 120
 gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgaggaa cattattata 180
 acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca 240
 taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg 300
 ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaacagctc 360
 tttctttcca tgggttggcc tagatctgaa ttcttagttc catgtaattc acaaaatcaa 420
 25 gttataattg tcttcttttc taaaatttat attgaaaata catgcatcac agaaaatttc 480
 cttttcaata tgattaaaat gtggttaata actacagatt taaaaacaat tgactaaata 540
 taa 543

ES 2 578 993 T3

<210> 55
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> artificial

5

<220>
 <223> Molécula de CET AS2-E24-AS8 que comprende DISE

<400> 55

10

```

atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa    60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca    120
gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgcgga cattattata    180
acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca    240
taaaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg    300
ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaacagctc    360
tttctttcca tgggttggcc tgaattccta caacttaaaa aatgaacata atggaataag    420
gatattttaa attattatgt taaaatgtta agtatacttg gagttggtga aaaaaaatca    480
attcatttat acagacaatc caagaaggta tgacacatta ctgttttcat aggaaaa    537
    
```

<210> 56
 <211> 545
 <212> ADN
 <213> artificial

15

<220>
 <223> molécula de CET AS2-DISE-E24-AS4

<400> 56

20

```

atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa    60
aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca    120
gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgcgga cattattata    180
acgttgctcg aaggctgagg gaaggactgt cctggggact ggtactaact gatatctctt    240
cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag    300
ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac    360
agctcaaaca atgcagagta agaagatctg aattcttagt tccatgtaat tcacaaaatc    420
aagttataat tgtcttcttt tctaaaattt atattgaaaa tacatgcatc acagaaaatt    480
tccctttcaa tatgattaaa atgtgggttaa taactacaga tttaaaaaca attgactaaa    540
tataa    545
    
```

<210> 57
 <211> 699
 <212> ADN
 <213> artificial

25

<220>
 <223> Moléculas de CET AS2-E24-DISE-2XAS4

30

ES 2 578 993 T3

<400> 57

| | |
|--|-----|
| atatattttc agatttaaaa agaataagta tacaacatgg gattttttaga atcaacaaaa | 60 |
| aaattagtct ttatatgtcc tcacatcaca gaagtttctc ttactagtat ttaatttcca | 120 |
| gacttaggct attaaaataa ctactcaata ctcgagagat ctccgcgaa cattattata | 180 |
| acgttgctcg aataactaact gatatctctt cttttttttt ttccggaaaa cagaatcaca | 240 |
| taaaaacctt acagaaatgg atggctgaag ttgatgtttt cctgaaagag gaatggcctg | 300 |
| ccctggggga tgctgaaatc ctgaaaaaac agctcaaaca atgcagagta agaacagctc | 360 |
| tttctttcca tgggttgccc tagatctgaa ttcttagttc catgtaattc acaaaatcaa | 420 |
| gttataattg tcttcttttc taaaatttat attgaaaata catgcatcac agaaaatttc | 480 |
| cctttcaata tgattaaaat gtggttaata actacagatt taaaaacaat tgactaaata | 540 |
| taagaattct tagttccatg taattcacia aatcaagtta taattgtctt cttttctaaa | 600 |
| atztatattg aaaatacatg catcacagaa aatttccctt tcaatatgat taaaatgtgg | 660 |
| ttaataacta cagatttaaa aacaattgac taaatataa | 699 |

5 <210> 58
 <211> 164
 <212> ADN
 <213> artificial

10 <220>
 <223> Secuencia antisentido AS3bis
 <400> 58

| | |
|---|-----|
| agagcctcaa aattaaatag aagttcattt acactaacac gcataattga tgagtttcat | 60 |
| tcatatcaag aagaaggtaa ataaaagttt atgtaattta gagatctaaa caaagtagaa | 120 |
| tatctgataa agcaatatat atgtattctt atgaataatt tcta | 164 |

15 <210> 59
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> artificial

<220>
 <223> Secuencia espaciadora

25 <400> 59
 ctcgagagat ctccgcgaa cattattata acgttgctcg aa 42

30 <210> 60
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

35 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina humana, exón 23
 <400> 60

ES 2 578 993 T3

gctttacaaa gttctctgca agagcaacaa agtggcctat actatctcag caccactgtg 60
 aaagagatgt cgaagaaagc gccctctgaa attagccgga aatatcaatc agaatttgaa 120
 gaaattgagg gacgctggaa gaagctctcc tcccagctgg ttgagcattg tcaaaagcta 180
 gaggagcaaa tgaataaact cggaaaaatt cag 213

<210> 61
 <211> 3453
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina humana, intrón 22

10

<400> 61
 gtctgtgaat atttgaatgt caaaacaata aagcacgctt atcaagcatt cacattgata 60
 taacctttaa ataatattag aatttaagtc attctgacaa gtatggtagt ttgccattg 120
 agcaaatgaa aatgagactt tacagtatta tttatgcata tactctatct atggatatat 180
 atgtatgggc atatatacat gctgtttttg aaaacaattg tatgatctat ttatgaagta 240
 tatttttaat ttagcatgca ttttcagatg tattgatttt gattattaga aaaaccattg 300
 ttttattccc cacctttgct tctttatttg taactcctgt cacattctca aactgggagg 360
 taaaatcagt gtacagtcac cccttcgcat ccatggggaa gtggttccag gaactcctat 420
 gaatatcaga attcacagat gttcaagtcc tttatatgaa tgggtgaata tttgcatata 480
 acttatgaac atgctcccat ataacttaac tcactctcgg attacttata atgcctaata 540
 caatgtaaat attatgaaaa tatgtgttat actgtattat ttaggaagta gtgacaatga 600
 aaaagtctta catgttttagt acagatgtag ttatttttgt caaatattat ctattagtag 660
 ttgactgaat ccactcattc agaatccaca aatatggagg gctggctata tttataaaat 720
 tggtttaaat ttaaacatta attttctgta atgtaatgag acatttgaat tctaatagct 780
 acattttttt aacatccttc tatcaggaaa gatatactaa tatgggaaat gaaagaaata 840
 atttgtaaga gattttataa tacttttctt actttatttt atttttagac ggagtttcat 900
 tcttggtgcc caggctggag tgcagcagtg ctatctcggc tcaactgcaac ctacgcctcc 960
 cgggttcaag tgattctcct gccttagcct cctgagtagc tgggattata gtgcgtgcca 1020
 tcacgcctgg ctaatttttg tattttttaa gtaaagatgg ggtttcacca tcttgccat 1080
 gctggctcct aactcctgac ctcagatgat ctgcctgcct cagcctccca aagtgcctgg 1140
 attacaggtg tgagccactg cggccagccc ttttctact tattataaaa tactacatta 1200

ES 2 578 993 T3

tatgttcaat aactttttat ttctgaagac atgaaaacgt attagttata tttagaagct 1260
gagataatat gtgcatttta agaaaaatgt ttaaaaattc aaatttaaac tttatcacat 1320
agaatTTTTT ttggataaatt aaatattttt ttgaagtaat gtattcaaag aaaaatacat 1380
ttaaacaact ttcattatgt attgtcctat ttagatattt attctactac aataccaaat 1440
ggtagctggt tcaccttttt tgtttccttt tgtttggtt tttaatgctt ggcataatga 1500
ttccaaagtc tatctggaaa aatgtgttgc ctaatagaac tagtaaaactt ttaaacataa 1560
gaataaaaat gtgcaagaat aagagtggag aaaacacaag aaaaggcagt tagatgagca 1620
gaagagacta tttccactga aaaagatagg aaagaaaata attgttcata aatattattg 1680
ggaaatgtat taactaacta aaaaaaaga tatgaacatt tccccaaag ttacaccaa 1740
ataaaaacca catacaataa aatgttcaa aaatgtgggg aagcccaat tttggaaaat 1800
atttaaaata ataatgttat aaaaatttag gtggagaagc ataaaaatcg atggaaacaa 1860
tcacaaacat tgtaaaaaca ccagagacaa ttttaaagaa atatgatacc aaggaatctt 1920
tttttttctg tgagtaagga agaaagtctt gagtaaggta tcctccaaa agagacatat 1980
atgaataata aacctatgaa taattgtaac ttaaattgta aaggaagaag taaaaaatt 2040
acaagatgag aatttttttt gcatactaaa ttgcatacac acaaaagata taagtaccaa 2100
tttgcaagtg gtgaaataaa aattgtctct tactgctgga aatgtaaatt caatatgaat 2160
tttactgagg ttaactcttc agtgcacct aataacatac aacattaata taatttccat 2220
gaaatctgta tctgatggaa ataatcagaa tacactcaaa gatgtaaag gaactggaga 2280
tagataggat attgattgat tgagggatgg atggatggat tagataggta ggtagataga 2340
gataaacata atttacagga gtggaaaact agaaatgaat gtgtagaact aataatggaa 2400
attgttgaac tagaaaagcc attacaattt ttgtttttga aaaaataatt atttgacatg 2460
ggcaaatgct cacactaaaa cacctagctc aaagtgtagt tatatgctag atattgtcta 2520
aataatcagt cataggggaa caatttgaaa aagtgaata aacttaaaaa agtaaagtaa 2580
aaaaacaaat taagtaccac caaataggca taggatacta tgaaactata aaacttagat 2640
atttgacaaa ttttgggttg atataggtca cattataggg gaaagaataa ctgtttatat 2700
gtgcatacat gatcatatat ttaatattta gctatacata gaacaaattg aaaatttata 2760
taaagtacta gtagttctgg ttttttttcc catttttgtc atgagccttt attattttat 2820
aaagtaaaag taacattaaa gtaaatattg aacaggggaa gtctaaagtt atgatcctac 2880
tgtaagaaat tacatgtggt atacagaata agtataaata aattttataa attctccaca 2940
aaactatcct tgaatcccac cataatacta cataacagaa taacattttt tgaaaatata 3000
ttaagtacat agattgttca ataagttttt ctattccata tatcaatatt attagctata 3060
gttttatgta gagtttactt tcctgaaagc tcagtataat taatttcaac tccattaact 3120

ES 2 578 993 T3

gtatcacaaa tgcagttatt aatatatata ctttaattcag taaaattaga tgcaccaaaa 3180
 ctttttggct ctgtaagata tagttttgag atatatttga cattgttcag aaaaatacat 3240
 atggagtgtt aaataccact aaataatatt caagttactc ttaggataat atgtaaaatt 3300
 taaattacca ctagaagttt ataactgata gaagatcadc tactttgttt acatgtttga 3360
 atcatataga tttcaagtac agttaatttc actaaaactc atcaattatt attcatcaat 3420
 tagggtaaat gtatttaaaa aattgttttt tag 3453

<210> 62
 <211> 3798
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia de nucleótidos del gen DMD de la distrofina humana, intrón 23

10

<400> 62

gtaattcaag attttacttt ctaccctcat ttttatttac ttgttttttc cctaacgata 60
 cactgtaaac tgtaaaggta cataagcatt tgaccttcag catctttcaa agttagtgag 120
 aagatgaaaa gacatgagtc ttttacaag gatggcgatt tgcttattcc ttctaggaaa 180
 agaataggag ttttctcagt gtttttagaa tgaattttct attttcacca ttaccaatag 240
 gaattaaaca tgtttttagt ttaataattt tcaaaaccaa tcatccattt agtctggttg 300
 tcttttaaga tacgggtaat catttagctt atgactagaa aaaagttatg tatatataca 360
 ttatacagag gtatattgta atcattttat atatataatg tatagtatgt atatgattat 420
 ttctatatt acctttcatt tctgctgttt tgctacttat aaaaagtagg agtcaactat 480
 gctgtctata tgtgctatta tatataaaat atggtgatat gttcataaaa ttgcattata 540
 tattcatccc attatgtata actccatata tgtatatgtg cagtagaaat gtaggtgtat 600
 taatgtccta tgatactcct aagaaattag cagaaattta atggcttcaa acaacacaaa 660
 tttattacat tactgttctg gaggtcagaa gttcagaatt aatctctgtg ggctaaaatt 720
 aagggtgtag cagaactgtg tctgttttgg agactttgaa agagaatgtg tgttattggc 780
 atttttagct tccatatata tatgtatata tatacacaca catacatata acatgtatat 840
 atgtgtgtat atatatatat atatacgtgt ataatggaat tatatatcat gtacatatat 900
 acatatctaa tgtaatatat atcacatatg taacctgttg tatatgtata ttaatgttac 960
 atatgtaata tatagtaata acttatttta tcaccatadc gaatttgtaa ttatatgctt 1020
 aaattttacc acatcacctt cttcctgaaa ccaaattccc ttgacttaat ttgtttgaat 1080
 agtgccacca tactaataac caetcaagct aaagaaaaac agtaaaccac caattgcatt 1140
 aaggctctaaa agcctaaaat attcaataag gtaagtaatg tgcctctga gtgggtcaatt 1200
 attgtgacaa atgttaatgc tgggaaggaa atgtcgaaaa cgttatggta tgatggaaaa 1260

ES 2 578 993 T3

acattgcaac aatatgctcc tggatttaaa tcccagtcta gctgcttagt ttttgtgctt 1320
 accttttaca aaccaaagca ctaagcaaac ctaaaacatt ttttaatgca tagcatttct 1380
 ttacttataa acatatgtgt acatgcatac ctatgtaaat actgcatgaa aatatctatt 1440
 atttgtcaag accagtggcc taagagggca caattacatg gctcttgta tcaaggagcc 1500
 cacattctag tgaaggagga aggtaggtgt attcatttcc tatggcactc ctaacaaatt 1560
 gccggaaatt taataaactic aagcaacaca aatttattag agttctggaa gtcaaaaagt 1620
 caggattagt ctcaagtggc taaaattaag gtgtcagcag gaactttgtct gttttggagg 1680
 ctttgcgaca gagtctgttt tattggcatt tttagcttct agaagcattc cttgtctcat 1740
 gtcccatcc tccatcttca aagtcagcag tgtaacatca tctagtgtca atttctctct 1800
 cctgtctat ctccctctcc ctctcttct acctctctt ctcaacctcc tttccctatc 1860
 ctgttccctg tgttgacttc cttttaatta ggaccttgt gattacatta tgccctggtg 1920
 gatgatccag tataatctcc ccatctcaga atccttaatg taatcacatc tgcaaagtcc 1980
 tttctggtaa tatactcaca ggtttcagag attaggggtga ggacatcttg ggggtagcat 2040
 tattcagcct tgcatggtaa ataaattaaa cagtatggga aaggttgtca cagtaggcag 2100
 gaaggaaatc caacataaac taggaaaaag gattatgaaa tattatcgga acataggtg 2160
 tctctgctat agattaaata ggtagaattt agttagctaa taccgagaaa gaaagagttc 2220
 ttgagaaagc atagcagcat tttcagttaa atgatataag ttcaacactg ggtagacaat 2280
 atatatgggg attaataaaa tattatggtt ggaaaactgg attgagagta gacagtgaat 2340
 gtccctggat gctatgtttt acaatctgag ttttaatcta gtggtgatgg gactgataat 2400
 aataacaata aaaacttaat aagaaaaaac tgctattggt taaagagggga aataatatga 2460
 ttccacttgt gttttcaaaa cattcccaag atgagaggaa ggaggagagg agattactgg 2520
 catcactgta gatcagtaat tagaatgagg tgagaccgag gcagatatca aaacgagcca 2580
 gtgcattaat ggagtcacta atgagacctg aacagcccag gcgtagtggc tcatgcctat 2640
 aatcccagca ctctgggcag ctgaggcagg tagatcacga ggtcaagaga tcaagaccat 2700
 gctggccaac atggcgaaac cctgtctcta ctaaaaacac aaaaattagc tgggcatggt 2760
 agtgcacgcc tgtaatccca gctacttggg aggctgaggc aggagaatgg cgtgaacctg 2820
 ggaggtggag gctgcagtga gccaaagtgt tgccacttca ctccagcctg ggcgacagag 2880
 caagactcca tctcaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaacaaaa aacaaacaaa aaaaaaaaaa 2940
 cctgaacaag gacagtgaag atgtgaaata agaacaaatg tagacttgaa agataacagc 3000
 aaggtgatcg tcttgaagtt ctcttagata aatagtttaa aaattattat taataatcac 3060
 attaaagggg aaactttctg tggagcacat attttcaatg taaatttaag taaaacagaa 3120
 gaaaataaca catgtagaca gcatagttga atcatacttt ttagaagtgg caaacagca 3180

gaaaaaaagg taatacggga aagaatcatg ggtgagagat actggctatt tataaatgat 3240
 aaaagatgat gatttttacc tgatcattac ttcgtactgg tcagacaaat aaaagcaaaa 3300
 gctctgtctt tgaagatgac aaaatattag tccaaaagtt cccaactgga aggactatct 3360
 aaactgtcat ctgtagaaaa taatttgtga aagttcgggt ttagggaggc tataaagaca 3420
 ccattacatt gagtttattg ttcatagttt gttttatgta ctgtaaggac acatttttag 3480
 tattctcatg agttgttttg taacttaaaa tttctctaga gggggatag atttaatggt 3540
 ctcgagagta acatcataaa accacatttg gtagtaattt tgtattttta acaatagcag 3600
 acttcacaca ccagtgtca tacagtagac cataaaaatg cagtcttagt aaaaatattc 3660
 tttgcctcaa gaactactta gagacatcct ttaaacaatg gaattgtttt tgggctgtg 3720
 tttagacata acacaatgat gaattgtgtt aaaagtaatc agcacaccag taatgcctta 3780
 taacgggtct cgtttcag 3798

5 <210> 63
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia humana del gen DMD de la distrofina, exón 23

<400> 63

Ala Leu Gln Ser Ser Leu Gln Glu Gln Gln Ser Gly Leu Tyr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ser Thr Thr Val Lys Glu Met Ser Lys Lys Ala Pro Ser Glu Ile Ser
 20 25 30
 Arg Lys Tyr Gln Ser Glu Phe Glu Glu Ile Glu Gly Arg Trp Lys Lys
 35 40 45
 Leu Ser Ser Gln Leu Val Glu His Cys Gln Lys Leu Glu Glu Gln Met
 50 55 60
 Asn Lys Leu Arg Lys Ile Gln
 65 70

15 <210> 64
 <211> 114
 <212> ADN
 <213> homo sapiens

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia de nucleótidos humana del gen DMD de la distrofina, exón 24

25 <400> 64

aatcacatac aaaccctgaa gaaatggatg gctgaagttg atgtttttct gaaggaggaa 60
 tggcctgccc ttggggattc agaaattcta aaaaagcagc tgaacagtg caga 114

30 <210> 65
 <211> 38

ES 2 578 993 T3

<212> PRT
<213> homo sapiens

5 <220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia humana del gen DMD de la distrofina, exón 24

<400> 65

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | His | Ile | Gln | Thr | Leu | Lys | Lys | Trp | Met | Ala | Glu | Val | Asp | Val | Phe |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | |
| Leu | Lys | Glu | Glu | Trp | Pro | Ala | Leu | Gly | Asp | Ser | Glu | Ile | Leu | Lys | Lys |
| | | 20 | | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| Gln | Leu | Lys | Gln | Cys | Arg | | | | | | | | | | |
| | | 35 | | | | | | | | | | | | | |

10
15 <210> 66
<211> 608
<212> ADN
<213> Mus musculus

20 <220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia murina del gen DMD de la distrofina, intrón 58

<400> 66

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| gtaattgaat | gtggaactgt | aataacatat | tgatagaggg | ctcagtgatg | agagcacagc | 60 |
| ccatccatgc | ttgctgccag | agtctgtata | gctctcacac | ttcagggtta | aacagaatca | 120 |
| attcaaatta | aatgtaggtg | ctgaaaaaga | atacagaatc | aaaaccacc | atgcacaatt | 180 |
| ctgttttcag | tcataaataa | agcaatcaat | gatcagttat | ttgaatattt | agaaaatggt | 240 |
| aagcaaaaga | tcttatctgt | gataagaagt | tctattgtta | caaagactgc | aagctaattt | 300 |
| tccgtttaag | ctgactgaaa | taaattggag | ctgttcagca | catgctaaca | tttttctctc | 360 |
| tgaaagctta | aatgaatctt | gatttacctg | attgacagaa | agtagaacag | attcactaag | 420 |
| gaagacagtt | tagctgtgct | tgactatata | aaaatttatg | ccaaagtgta | aaagagccat | 480 |
| taatcagtaa | gttggcctcg | tgtaaatcta | tattcctttc | ctttctteta | gtctgacctt | 540 |
| ttcaaccatg | tttttttttt | ttaacaaaaa | tggatgtgac | cttaaacctt | gtcatattgc | 600 |
| caatttag | | | | | | 608 |

25 <210> 67
<211> 608
<212> ADN
<213> Homo sapiens

30 <220>
<221> misc_feature
<223> Secuencia humana del gen DMD de la distrofina, intrón 58

<400> 67

35

ES 2 578 993 T3

gtaattgaat gtggaactat aataacatat tgatagaagg atcagtgggtg acggagcagc 60
 ccatccattc ttgctgccag ggtctggata gctctcatat tttcttggtt aaatagaatc 120
 aattcaaatt aaacatagat gctgaaaaaa aaataaggac tcataaacta ccatgcataa 180
 atcagtttgt gcattcataa ataaacatca aaagagatta gcaatcagtt attggaacat 240
 ttagaaaata ataaacaaag ggagttatct gtgaggagga attctattgt tgcaaagact 300
 acaagttaat tttccattta agagcctgcc tgaagtaaat tagagcttgt ggtatgcac 360
 ctaacgtttt tctcctcaat agcttaagtg aatcttaaat tgtcggattg atataaggta 420
 gaaactcagg aagatatact ttagatgttc tgggctgtat caaaatttat gccaaagtat 480
 aaaaaagccg ttaatcagta ggttaccctc ttgttcaact gtactcttcc tttcttccag 540
 tatgaccttt ttgacaatgt ttaaaaaaaaa agaatgtggc ctaaaacctt gtcattatgc 600
 caatttag 608

5 <210> 68
 <211> 150
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia antisentido respecto al intrón 58 de DMD
 <400> 68

aaaattaact tgtagtcttt gcaacaatag aattcctcct cacagataac tcccttggtt 60
 tattatcttc taaatgttcc aataactgat tgctaactctc ttttgatgtt tatttatgaa 120
 tgcacaaact gatttatgca tggtagttta 150

15 <210> 69
 <211> 2390
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia murina del gen DMD de la distrofina, exones 59 a 79
 <400> 69

25 aactgcctcc tgaagaaaga gctcagaatg tcaactcggct cctacgaaag caggctgaag 60
 aggtcaacgc tgaatgggac aaattgaacc tgcgctcagc tgattggcag agaaaaatag 120
 atgaagctct tgaagactc caggaacttc aggaagctgc cgatgaactg gacctcaagt 180
 tgcgccaaagc tgaggtgatc aaggatcct ggcagccagt gggggatctc ctcatgact 240
 ctctgcaaga tcaccttgaa aaagtcaagg cacttcgggg agaaattgca cctcttaag 300
 agaatgtcaa tcgtgtcaat gacctgcac atcagctgac cacactgggc attcagctct 360

ES 2 578 993 T3

caccttataa cctcagcact ttggaagatc tgaataccag atggaggctt ctacaggtgg 420
ctgtggagga ccgtgtcaga cagctgcatg aagcccacag ggactttggt cctgcatccc 480
agcacttctt ttccacttca gttcagggtc cctgggagag agccatctca ccaaacaag 540
tgcctacta tatcaaccac gagaccctaa ccaacttggt ggaccacccc aaaatgacag 600
agctctacca gtcttttagct gacctgaata atgtcagggt ctccgcgtat aggactgcca 660
tgaagctcag aaggctccag aaggcccttt gcttgatct cttgagcctg tcagctgcat 720
gtgatgcctt ggaccagcac aacctcaagc aaaatgacca gcccatggat atcctgcaga 780
taattaactg ttgactaca atttatgatc gtctggagca agagcacaac aatctgggtca 840
atgtccctct ctgtgtggat atgtgtctca actggcttct caatgtttat gatacgggac 900
gaacagggag gatccgtgtc ctgtctttta aaactggcat catttctctg tgtaaagcac 960
acttgaaga caagtacaga taccttttca agcaagtggc aagttcaact ggcttttgtg 1020
accagcgtag gctgggtctt cttctgcatg attctattca aatcccaaga cagttgggtg 1080
aagttgcttc ctttgggggc agtaacattg agccgagtgt caggagctgc ttccaatttg 1140
ccaataataa acctgagatt gaagctgctc tcttccttga ctggatgctc ctggaacccc 1200
agtctatggt gtggtgccc gtcttgaca gagtggtgc tgctgaaact gccaaagcctc 1260
aagccaagtg taacatctgt aaggagtgtc caatcattgg attcaggtac agaagcctaa 1320
agcattttta ttatgacatc tgccaaagt tcttttttcc tggccgagtt gcaaagggcc 1380
ataaaatgca ctaccccatg gtagagtatt gcaactccgac tacatccgga gaagatgttc 1440
gcgacttctc caaggtacta aaaaacaaat ttcgaaccaa aaggtatttt gcgaagcctc 1500
cccgaatggg ctacctgcca gtgcagactg tggtagaggg ggacaacatg gaaactcccg 1560
ttactctgat caacttctgg ccagtagatt ctgcgcctgc ctctcccc cagctttcac 1620
acgatgatac tcattcacgc attgaacatt atgctagcag gctagcagaa atggaaaaca 1680
gcaatggatc ttatctaaat gatagcatct ctccaatga gagcatagat gatgaacatt 1740
tgtaaatcca gcattactgc caaagtttga accaggactc ccccctgagc cagcctcgta 1800
gtcctgcccc gatcttgatt tccttagaga gtgaggaaag aggggagcta gagagaatcc 1860
tagcagatct tgaggaagaa aacaggaatc tgcaagcaga atatgatcgc ctgaagcagc 1920
agcatgagca taaaggcctg tctccactgc catctctctc tgagatgatg cccacctctc 1980
ctcagagtcc cagggatgct gagctcattg ctgaggctaa gctactgctc caacacaaag 2040
gacgcctgga agccaggatg caaatcctgg aagaccacaa taaacagctg gagtctcagt 2100
tacatagact gagacagctc ctggagcagc cccaggctga agctaagggtg aatggcacca 2160
cgggtgtctc tccttccacc tctctgcaga ggtcagatag cagtcagcct atgctgctcc 2220
gagtggttgg cagtcaaact tcagaatcta tgggtgagga agatcttctg agtcctcccc 2280
aggacacaag cacagggtta gaagaagtga tggagcaact caacaactcc ttcctagtt 2340
caagaggaag aatgcccc ggaaagccaa tgagagagga cacaatgtag 2390

ES 2 578 993 T3

<210> 70
 <211> 2390
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia humana del gen DMD de la distrofina, exones 59 a 79

10

<400> 70

```

agctgcctcc tgaggagaga gcccagaatg tcaactcggct tctacgaaag caggctgagg      60
aggtcaatac tgagtgggaa aaattgaacc tgcaactccgc tgactggcag agaaaaatag      120
atgagaccct tgaaagactc caggaacttc aagaggccac ggatgagctg gacctcaagc      180
tgcgccaagc tgaggtgatc aagggatcct ggagcccggt gggcgatctc ctcatcgact      240
ctctccaaga tcacctcgag aaagtcaagg cacttcgagg agaaattgog cctctgaaag      300
agaacgtgag ccacgtcaat gaccttgctc gccagcttac cactttgggc attcagctct      360
caccgtataa cctcagcact ctggaagacc tgaacaccag atggaagctt ctgcaggtgg      420
ccgtcgagga cogagtcagg cagctgcatg aagcccacag ggactttggt ccagcatctc      480
agcactttct ttccacgtct gtccagggtc cctgggagag agccatctcg ccaaacaag      540
tgcctacta tatcaaccac gagactcaaa caacttgctg ggaccatccc aaaatgacag      600
agctctacca gtcttttagct gacctgaata atgtcagatt ctcaagcttat aggactgcca      660
tgaaactcog aagactgcag aaggcccttt gottggatct cttgagcctg tcagctgcat      720
gtgatgcctt ggaccagcac aacctcaagc aaaatgacca gcccatggat atcctgcaga      780
ttattaattg tttgaccact atttatgacc gcctggagca agagcacaac aatttgggtca      840
acgtccctct ctgcgtggat atgtgtctga actggctgct gaatgtttat gatacgggac      900
gaacagggag gatccgtgct ctgtctttta aaactggcat catttcctctg tgtaaagcac      960
atitggaaga caagtacaga taccttttca agcaagtggc aagttcaaca ggatitgtg      1020
accagcgcag gctgggcctc cttctgcatg attctatcca aattccaaga cagttgggtg      1080
aagttgcatc ctttgggggc agtaacattg agccaagtgt cgggagctgc ttccaatttg      1140
ctaataataa gccagagatc gaagcggccc tcttcctaga ctggatgaga ctggaacccc      1200
agtccatggg gtggctgccc gtccctgcaca gactggctgc tgcagaaact gccaaagcatc      1260
aggccaaatg taacatctgc aaagagtgtc caatcattgg attcaggtac aggagtctaa      1320
agcactttaa ttatgacatc tgccaaagct gctttttttc tggctgagtt gcaaaaggcc      1380
ataaaatgca ctatcccatg gtggaatatt gcaactccgac tacatcagga gaagatgttc      1440
gagactttgc caaggtacta aaaaacaaat ttcgaaccaa aaggtatitit gcgaagcatc      1500
    
```


ES 2 578 993 T3

cccgaatggg ctacctgcca gtgcagactg tcttagaggg ggacaacatg gaaactcccg 1560
 ttactctgat caacttctgg ccagtagatt ctgcgccctgc ctogtcccct cagctttcac 1620
 acgatgatac tcattcacgc attgaacatt atgctagcag gctagcagaa atggaaaaca 1680
 gcaatggatc ttatctaaat gatagcatct ctccctaatga gagcatagat gatgaacatt 1740
 tgtaaatcca gcattactgc caaagtttga accaggactc cccctgagc cagcctcgta 1800
 gtccctgcca gatcttgatt tccttagaga gtgaggaaag aggggagcta gagagaatcc 1860
 tagcagatct tgaggaagaa aacaggaatc tgcaagcaga atatgaccgt ctaaagcagc 1920
 agcacgaaca taaaggcctg tccccactgc cgtcccctcc tgaaatgatg cccacctctc 1980
 cccagagtcc ccgggatgct gagctcattg ctgaggccaa gctactgogt caacacaaag 2040
 gccgcctgga agccaggatg caaatcctgg aagaccacaa taaacagctg gagtcacagt 2100
 tacacaggct aaggcagctg ctggagcaac cccaggcaga ggccaaagtg aatggcacia 2160
 cgggtgcctc tccttctacc tctctacaga ggtccgacag cagtcagcct atgctgctcc 2220
 gagtggttgg cagtcaaaact tcggactcca tgggtgagga agatcttctc agtccctccc 2280
 aggacacaag cacagggtta gaggaggtga tggagcaact caacaactcc ttccttagtt 2340
 caagaggaag aaatacccct ggaaagccaa tgagagagga cacaatgtag 2390

<210> 71
 <211> 2617
 <212> ADN
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> MPT simple

10

<400> 71

aaaattaact tgtagtcttt gcaacaatag aattcctcct cacagataac tccctttggt 60
 tattattttc taaatgttcc aataactgat tgctaatctc ttttgatggt tattttatgaa 120
 tgcacaaaact gatttatgca tggtagttta ggtaccccg c ggaacattat tataacgttg 180
 ctogaatact aactgatata tcttcttttt ttttttccgg aaaacagagc tgcctcctga 240
 ggagagagcc cagaatgtca ctccgcttct acgaaagcag gctgaggagg tcaatactga 300
 gtgggaaaaa ttgaacctgc actccgctga ctggcagaga aaaatagatg agacccttga 360
 aagactccag gaacttcaag aggccacgga tgagctggac ctcaagctgc gccaaagctga 420
 ggtgatcaag ggatcctggc agcccgtggg cgatctcctc attgactctc tccaagatca 480
 cctcgagaaa gtcaaggcac ttcgaggaga aattgogcct ctgaaagaga acgtgagcca 540
 cgtcaatgac cttgctcgcc agcttaccac tttgggcatt cagctctcac cgtataacct 600
 cagcactctg gaagacctga acaccagatg gaagcttctg caggtggccg tcgaggaccg 660
 agtcaggcag ctgcatgaag cccacagggc ctttgggtcca gcctctcagc actttctttc 720

ES 2 578 993 T3

cacgtctgtc cagggtcacct gggagagagc catctcgcca aacaaagtgc cctactatat 780
caaccacgag actcaaacaa cttgctggga ccatcccaa atgacagagc tctaccagtc 840
tttagctgac ctgaataatg tcagattctc agcttatagg actgccatga aactccgaag 900
actgcagaag gccctttgct tggatctctt gagcctgtca gctgcatgtg atgccttggg 960
ccagcacaac ctcaagcaaa atgaccagcc catggatata ctgcagatta ttaattgttt 1020
gaccactatt tatgaccgcc tggagcaaga gcacaacaat ttgggtcaacg tccctctctg 1080
cgtggatatg tgtctgaact ggctgctgaa tgtttatgat acgggacgaa cagggaggat 1140
ccgtgtcctg tcttttaaaa ctggcatcat tccctgtgt aaagcacatt tgggaagacaa 1200
gtacagatac cttttcaagc aagtggcaag ttcaacagga ttttgtgacc agcgcaggct 1260
gggcctcctt ctgcatgatt ctatccaaat tccaagacag ttgggtgaag ttgcatcctt 1320
tgggggcagt aacattgagc caagtgtccg gagctgctc caatttgcta ataataagcc 1380
agagatcgaa gcgccctct tctagactg gatgagactg gaacccagc ccatgggtgtg 1440
gctgcccgtc ctgcacagag tggctgctgc agaaactgcc aagcatcagg ccaaagttaa 1500
catctgcaaa gagtgtccaa tcattggatt caggtacagg agtctaaagc actttaatta 1560
tgacatctgc caaagctgct tttttctgg tcgagttgca aaaggccata aaatgcacta 1620
tcccatggtg gaatattgca ctccgactac atcaggagaa gatgttcgag actttgcaa 1680
ggtactaaaa aacaaatttc gaacccaaaag gtattttgcg aagcatcccc gaatgggcta 1740
cctgccagtg cagactgtct tagaggggga caacatggaa actcccgtta ctctgatcaa 1800
cttctggcca gtagattctg cgctgcctc gtcccctcag ctttcacacg atgatactca 1860
ttcaagcatt gaacattatg ctagcaggct agcagaaatg gaaaacagca atggatctta 1920
tctaaatgat agcatctctc ctaatgagag catagatgat gaacatttgt taatccagca 1980
ttactgcaa agtttgaacc aggactcccc cctgagccag cctcgtagtc ctgcccagat 2040
cttgatttcc ttagagagtg aggaaagagg ggagctagag agaatcctag cagatottga 2100
ggaagaaaac aggaatctgc aagcagaata tgacctcta aagcagcagc acgaacataa 2160
aggcctgtcc ccactgcogt cccctcctga aatgatgcc acctctccc agagtccccg 2220
ggatgctgag ctattgctg aggccaagct actgctcaa cacaaggcc gcctggaagc 2280
caggatgcaa atcctggaag accacaataa acagctggag tcacagttac acaggctaag 2340
gcagctgctg gagcaacccc aggcagaggc caaagtgaat ggcacaacgg tgcctctcc 2400
ttctacctct ctacagaggt ccgacagcag tcagcctatg ctgctccgag tggttggcag 2460
tcaaacttcg gactccatgg gtgaggaaga tcttctcagt cctccccagg acacaagcac 2520
agggttagag gaggtgatgg agcaactcaa caactcctc cctagttcaa gaggaagaaa 2580
taccctgga aagccaatga gagaggacac aatgtag 2617

<210> 72
<211> 137

ES 2 578 993 T3

<212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia humana del gen DMD de la distrofina, exón 70

<400> 72

| | | |
|----|---|-----|
| | actacatcag gagaagatgt tcgagacttt gccaaagtac taaaaaaca atttcgaacc | 60 |
| | aaaaggtatt ttgcgaagca tccccgaatg ggctacctgc cagtgcagac tgtcttagag | 120 |
| 10 | ggggacaaca tggaaac | 137 |

<210> 73
 <211> 137
 <212> ADN
 15 <213> Mus musculus

<220>
 <221> misc_feature
 <223> Secuencia murina del gen DMD de la distrofina, exón 70

20 <400> 73

| | | |
|--|--|-----|
| | actacatccg gagaagatgt tcgagacttc gccaaagtac taaaaaaca atttcgaacc | 60 |
| | aaaaggtatt ttgcgaagca tccccgaatg ggctacctgc cagtgcagac tgtgtagag | 120 |
| | ggggacaaca tggaaac | 137 |

REIVINDICACIONES

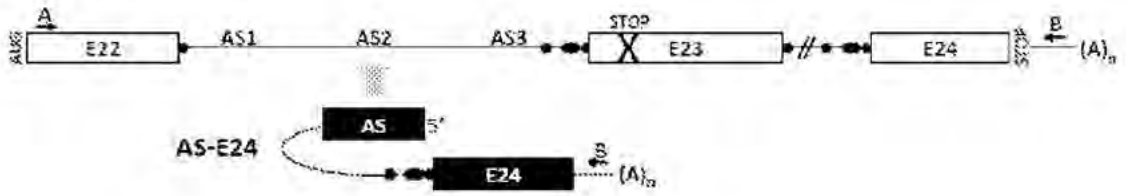
1. Molécula de ácido nucleico que comprende:
 - 5 a) dos dominios de unión a diana AS y AS' que dianizan la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm del gen de la distrofina (*DMD*), en la que los dos dominios de unión a diana AS y AS' están ubicados en el extremo 5' y en el extremo 3', respectivamente, de la molécula de ácido nucleico,
 - 10 b) una región de corte y empalme en 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo de polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme en 3',
 - c) una región de corte y empalme en 5' que comprende un sitio donante de corte y empalme en 5',
 - 15 d) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme en 3' del dominio de unión a diana de extremo 5' AS,
 - e) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme en 5' del dominio de unión a diana de extremo 3' AS', y
 - 20 f) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm diana, en la que dicha secuencia de nucleótidos codifica por lo menos una parte del polipéptido distrofina y se encuentra ubicada entre la región de corte y empalme en 3' y la región de corte y empalme en 5' de dicho ácido nucleico, y en la que:
 - 25 • el dominio de unión a diana de extremo 5' AS dianiza la unión del ácido nucleico al intrón 22 del pre-ARNm del gen *DMD*; o
 - el dominio de unión a diana de extremo 5' AS comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre: SEC ID nº 13 y SEC ID nº 14; o
 - 30 • el dominio de unión a diana de extremo 3' AS' dianiza la unión del ácido nucleico al intrón 23 del pre-ARN del gen *DMD*; o
 - 35 • el dominio de unión a diana de extremo 5' AS dianiza la unión del ácido nucleico al intrón 22 del pre-ARNm del gen *DMD* y el dominio de unión a diana de extremo 3' AS' dianiza la unión del ácido nucleico al intrón 23 del pre-ARN del gen *DMD*; o
 - 40 • el dominio de unión a diana de extremo 5' AS comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre: SEC ID nº 13 y SEC ID nº 14, el dominio de unión a diana de extremo 3' AS' dianiza la unión del ácido nucleico al intrón 23 del pre-ARN del gen *DMD*.
2. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1, en la que cada uno de los dominios de unión a diana AS y AS' comprende entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 nucleótidos, preferentemente aproximadamente 150 nucleótidos.
- 45 3. Molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1 y 2, en la que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos un exón del gen *DMD*.
- 50 4. Molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 3, en la que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende por lo menos la secuencia del exón 23 del gen *DMD* o la secuencia del exón 70 del gen *DMD*.
- 55 5. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 4, en la que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans comprende el exón 23 del gen humano (SEC ID nº 60).
- 60 6. Molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 5, en la que el dominio de unión a diana de extremo 3' AS' dianiza la unión del ácido nucleico a una secuencia de nucleótidos ubicada en la mitad 5' de la secuencia de nucleótidos del intrón 23.
7. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 6, en la que el dominio de unión a diana de extremo 3' AS' comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de una de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre: SEC ID nº 16, SEC ID nº 19 y SEC ID nº 20.
- 65 8. Molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 7, en la que el dominio de unión a diana de extremo 3' AS' comprende por lo menos 20 nucleótidos sucesivos de la SEC ID nº 21.

9. Molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 8, en la que los dos espaciadores comprenden entre 10 y 100 nucleótidos, preferentemente entre 30 y 50 nucleótidos.
- 5 10. Molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 9, en la que el punto de ramificación es una secuencia de punto de ramificación de levadura conservada y es preferentemente la SEC ID nº 25.
- 10 11. Molécula de ácido nucleico según las reivindicaciones 1 a 10, en la que el espaciador que separa el sitio donante de corte y empalme en 5' y el dominio de unión a diana de extremo 3' AS' comprende un potenciador intrónico de corte y empalme aguas abajo (DISE), preferentemente la secuencia de DISE del gen FGFR2 de rata (SEC ID nº 27).
- 10 12. Molécula de ácido nucleico que comprende:
- 15 a) un dominio de unión a diana (AS) que dianiza la unión de la molécula de ácido nucleico al pre-ARNm del gen de la distrofina (*DMD*),
- 15 b) una región de corte y empalme en 3' que comprende un punto de ramificación, un tramo de polipirimidina y un sitio aceptor de corte y empalme en 3',
- 20 c) una secuencia espaciadora que separa la región de corte y empalme en 3' del dominio de unión a diana AS,
- 20 d) una secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans al pre-ARNm diana, en la que dicha secuencia de nucleótidos comprende por lo menos un exón seleccionado de entre los exones 59 a 79 del gen *DMD* (SEC ID nº 70), preferentemente el exón 70 del gen *DMD* (SEC ID nº 72).
- 25 13. Vector recombinante que comprende el ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Célula que comprende la molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o el vector recombinante según la reivindicación 13.
- 30 15. Método *in vitro* para sustituir un exón endógeno mutado del gen *DMD* dentro de una célula, que comprende poner en contacto el pre-ARNm celular del gen *DMD* con la molécula de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, bajo unas condiciones en las que la secuencia de nucleótidos que debe cortarse y empalmarse en trans se corta y empalma en trans al pre-ARNm diana del gen *DMD* para formar un ARNm recombinado dentro de la célula.
- 35 16. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o vector según la reivindicación 13, o célula según la reivindicación 14, para la utilización en la corrección de un defecto genético de la DMD en un sujeto.
- 40 17. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la utilización en la corrección de por lo menos una mutación genética presente en por lo menos un gen *DMD* en un sujeto que la necesita.
18. Ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para la utilización en el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne.

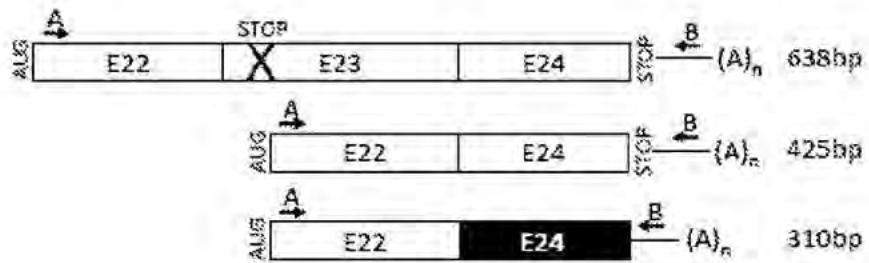
Figura 1

A

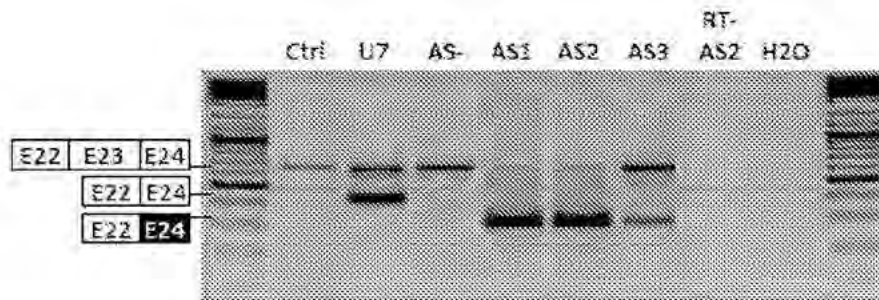
minigén DMD



B



C



D

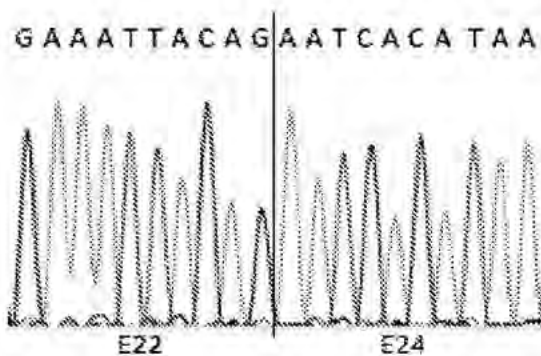


Figura 2

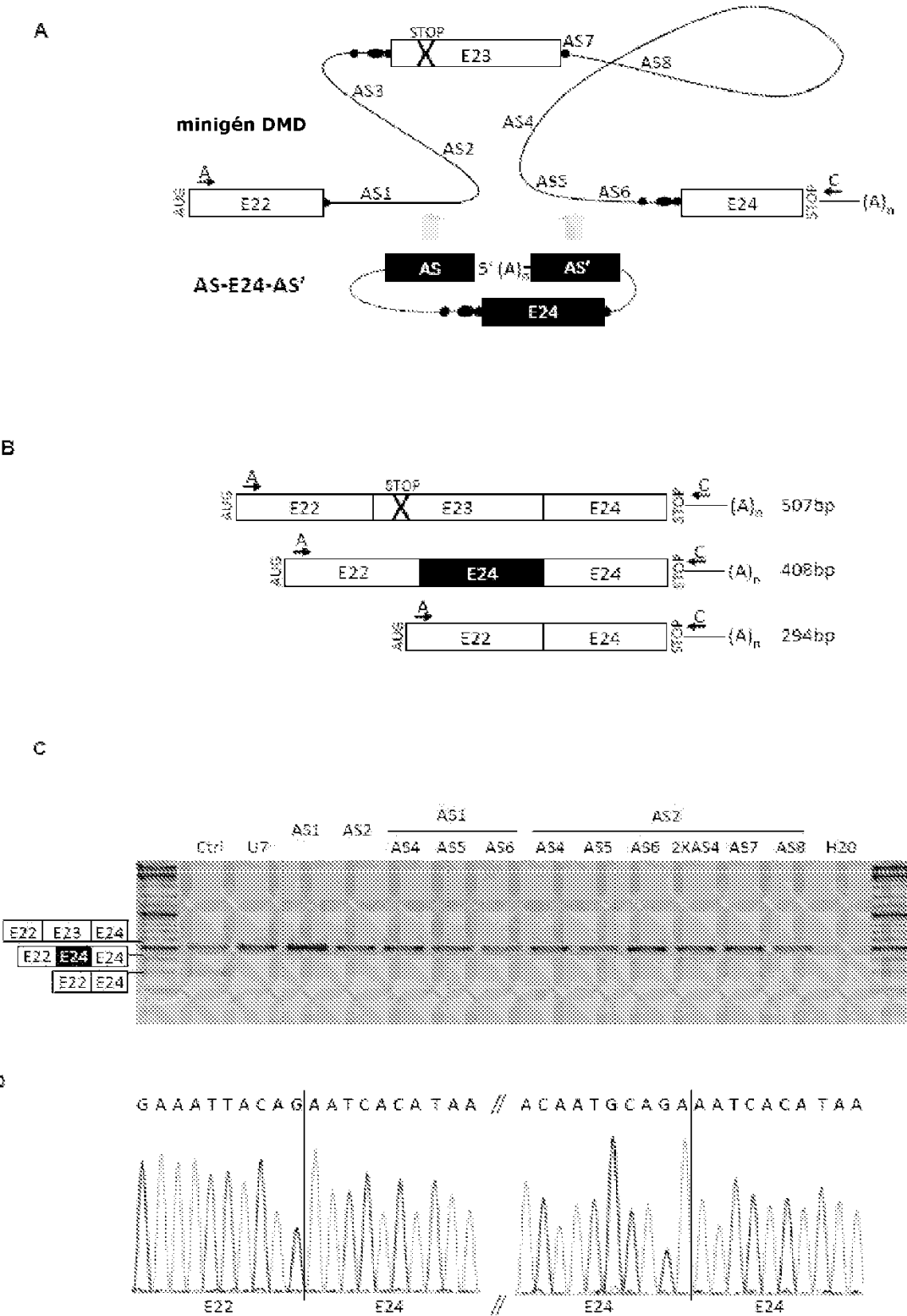


Figura 3

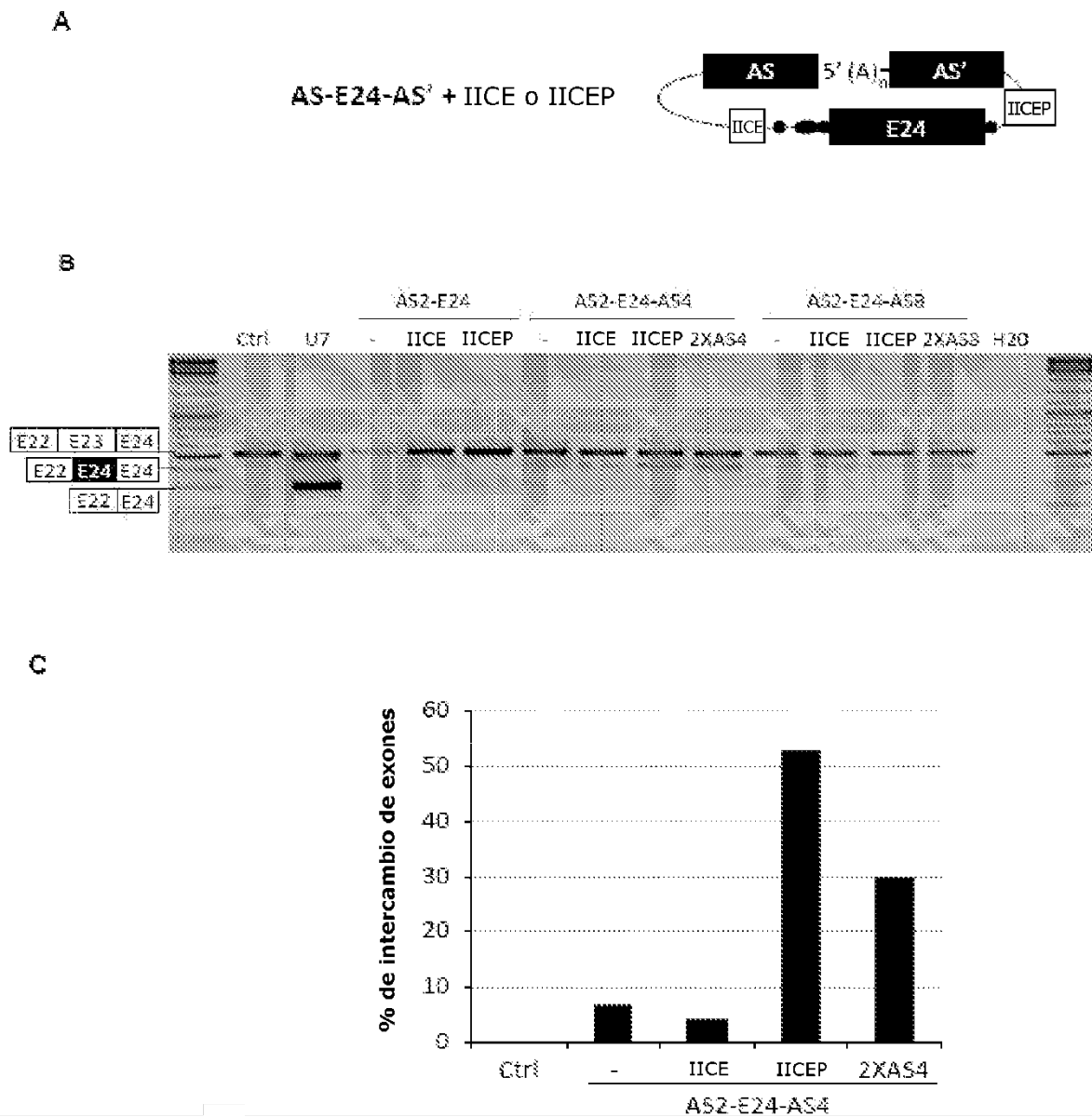


Figura 4

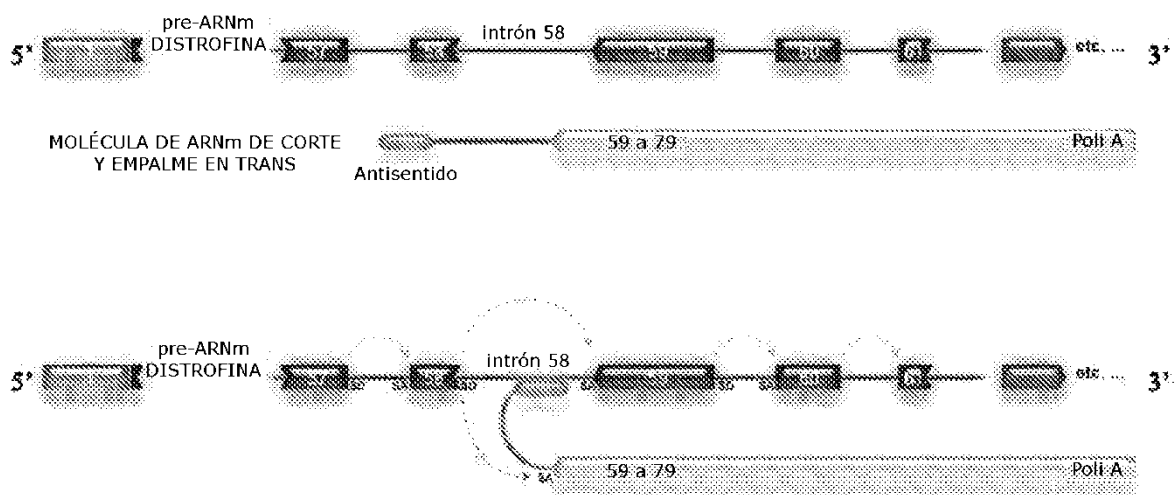
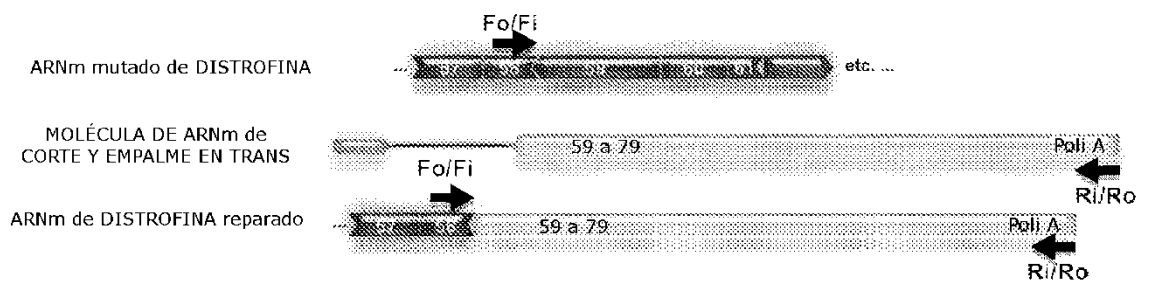


Figura 5

A



B

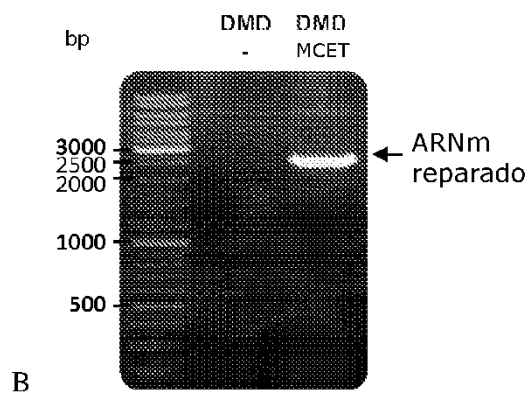


Figura 6

