

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 596 977**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/7105** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.09.2011 E 11179924 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2426203**

54 Título: **Agentes útiles en el tratamiento de la distrofia muscular facioescapulohumeral**

30 Prioridad:

**02.09.2010 EP 10175125**

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

**13.01.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ DE MONS (100.0%)  
Place du Parc 20  
7000 Mons, BE**

72 Inventor/es:

**BELAYEW, ALEXANDRA;  
COPPÉE, FRÉDÉRIQUE;  
VANDERPLANCK, CÉLINE;  
WILTON, STEPHEN DONALD y  
ANSSEAU, EUGÉNIE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 596 977 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

Agentes útiles en el tratamiento de la distrofia muscular facioescapulohumeral

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere en líneas generales a enfermedades y afecciones cuyo tratamiento puede beneficiarse a partir de la reducción de la expresión de la doble homeocaja 4 y/o doble homeocaja 4c. Dichas enfermedades y afecciones incluyen, entre otras, las que comprenden niveles aumentados y/o actividad aumentada de doble homeocaja 4 y/o de doble homeocaja 4c, e incluyendo más particularmente la distrofia muscular facioescapulohumeral. Dichas enfermedades y afecciones también incluyen las que comprenden la expresión de una proteína de fusión entre DUX4 o DUX4c y otra proteína no relacionada, más particularmente en las que la enfermedad o afección es un tumor, incluso más particularmente un sarcoma tal como de la familia de tumores de Ewing, sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados y rhabdomyosarcomas. La memoria descriptiva se refiere a agentes, más específicamente a agentes antisentido y a agentes de interferencia de ARN, que puede reducir o anular la expresión de la doble homeocaja 4 y/o de la doble homeocaja 4c, y elaborar métodos, usos y aspectos adicionales empleando dichos agentes.

## 20 Antecedentes de la invención

La distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD, FSHMD o FSH), también conocida como distrofia muscular de Landouzy-Dejerine, es un trastorno muscular dominante autosómico que afecta a aproximadamente 1/20.000 nacimientos. Se caracteriza por debilidad progresiva y atrofia de los músculos de la cara, de las extremidades superiores y de la cintura escapular a las extremidades inferiores.

La FSHD está genéticamente está relacionada con contracciones de la matriz de repetición D4Z4 en la región subtelomérica 4q35. Los individuos no afectados típicamente tienen entre 11-100 copias del elemento D4Z4 de 3,3-kb, mientras que los pacientes con FSHD solo tienen 1-10 copias. Un rasgo típico asociado con el defecto genético es un aumento en la metilación del ADN de la matriz D4Z4 contraída en comparación con los individuos no afectados (van Overveld *et al.* 2005 (Ann Neurol. 58: 569-76.)). Mientras que un pequeño grupo de pacientes con un fenotipo FSHD típico presenta más de 10 copias del elemento D4Z4, su nivel de metilación de ADN es bajo, similar al encontrado en matrices D4Z4 contraídas. La hipometilación del ADN está típicamente asociada con una estructura abierta de la cromatina adecuada para la transcripción (de Greef *et al.* 2009 (Hum Mutat. 30: 1449-59)).

Gabriëls *et al.* 1999 (Gene 236(1): 25-32) identificaron el gen la doble homeocaja 4 (*DUX4*) dentro de cada elemento D4Z4 repetido en la matriz. La secuencia de *DUX4* se corrigió más tarde, como publicaron Kowaljow *et al.* 2007 (Neuromuscul Disord 17: 611-23) y se encuentra disponible con el número de registro de Genbank NCBI: AF117653.2. Estudios posteriores mostraron que la proteína *DUX4* codificada se expresaba en mioblastos y en biopsias de pacientes con FSHD pero no en individuos no afectados, y que la proteína *DUX4* es un factor de transcripción que se dirige a un gran conjunto de genes incluyendo, entre otros, genes que codifican otros factores de transcripción, y que la activación del gen *DUX4* en el locus de FSHD inicia una cascada de transcripción que conduce a atrofia muscular, inflamación, potencial de diferenciación disminuido y estrés oxidativo, recapitulando los rasgos clave de la FSHD (Bosnakowski *et al.* 2008 (EMBO J 27(20): 2766-79); Kowaljow *et al.* 2007 (Neuromuscul Disord 17: 611-23); Dixit *et al.* 2007 (Proc Natl Acad Sci USA 104: 18157-18162)). Por tanto, la doble homeocaja 4 se considera como un contribuyente principal en la patología de los músculos con FSHD.

Dixit *et al.* 2007 (citado anteriormente) también demostraron en cultivos de mioblastos que mientras que la transcripción puede iniciarse en cualquier elemento D4Z4 dentro de la matriz de repetición, un ARNm de *DUX4* estable prevalente se origina desde la unidad D4Z4 más distal y se extiende hacia el interior de la región *pLAM* que flanquea el lado telomérico de la matriz D4Z4, mediante lo cual la región *pLAM* proporciona el transcrito *DUX4* con un intrón y una señal de poliadenilación (Figuras 1 y 2). Sin embargo, también se identificaron transcritos adicionales que abarcaban diversas unidades D4Z4, que podían tener varias porciones cortadas y empalmadas fuera, y que también podían comprender la región *pLAM* (Snider *et al.* 2009. Hum Mol Genet 18: 2414-30; Coppée *et al.*, bibliografía no publicada, véanse las Figuras 26-28). Además, se han encontrado polimorfismos en la región *pLAM* tales como la presencia o ausencia de una secuencia de 1,6 kb dentro de su intrón (Gabriëls *et al.* 1999, citado anteriormente; van Deutekom *et al.* 2009. Hum Mutat 30: 1449-59).

Lemmers *et al.* 2010 (Science, 19 de agosto) propusieron un modelo genético unificador para la FSHD.

Adicionalmente, el gen *DUX4c* homólogo se identificó centromérico a 42 kb de la matriz D4Z4, dentro de una unidad D4Z4 solitaria inversa y truncada. El gen *DUX4c* codifica una proteína de 47 kDa con un doble homeodominio idéntica a *DUX4* pero divergente en la región carboxilo terminal. La proteína *DUX4c* se expresa a bajos niveles en músculos de control, se induce en músculos de pacientes que padecen distrofia muscular de Duchenne y está presente a niveles similares, o incluso más elevados, en músculos con FSHD. Experimentos adicionales sugieren que la *DUX4c* podría estar implicada en la proliferación de mioblastos durante la regeneración del músculo y que cambios en su expresión podrían contribuir a la patología FSHD (Ansseau *et al.* 2009 (PLoS One 4(10): e7482).

En determinados tipos de tumores se ha observado un gen de fusión que incluye la región 3' del gen *DUX4* como resultado de reordenamientos cromosómicos. En la familia de tumores de Ewing (FTE) y en sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados (STBI) (Yoshimoto *et al.* 2009. *Cancer Genet Cytogenet* 195: 1-11) se observó la fusión entre *CIC*, un homólogo humano de *Drosophila capicua* y *DUX4* (Kawamura-Saito *et al.* 2006. *Hum Mol Genet* 15: 2125-2137), y en rhabdomyosarcomas (RMS) se mostró la fusión entre el gen *EWSR1* y *DUX4*. (Sirvent *et al.* 2009. *Cancer Genet Cytogenet* 195: 12-08). Como consecuencia de la fusión con el fragmento C terminal de *DUX4* las proteínas de fusión resultantes adquieren una actividad transcripcional potenciada, lo que conduce a la formación de tumores.

10 Sumario de la invención

La presente invención proporciona la materia objeto como se expone en uno cualquiera y en todos los puntos (i) a (xx) siguientes:

15 (i) Un agente antisentido capaz de unirse a un pre-ARNm de doble homeocaja 4 (*DUX4*) o un pre-ARNm de doble homeocaja 4c (*DUX4c*), en el que el agente antisentido puede unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4* o *DUX4c* o que puede unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* o *DUX4c*, y el que el agente antisentido es un oligonucleótido antisentido o un análogo de oligonucleótido antisentido, para su uso como un medicamento.

20 (ii) El agente antisentido para su uso de acuerdo con el punto (i) anterior capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4* pero no para el del pre-ARNm de *DUX4c*, o capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* pero no para la del pre-ARNm de *DUX4c*.

25 (iii) El agente antisentido para su uso de acuerdo con el punto (i) anterior capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4c* pero no para el del pre-ARNm de *DUX4* o, capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4c* pero no para la del pre-ARNm de *DUX4*.

30 (iv) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i) a (iii) anteriores, en el que:

35 - el agente antisentido tiene una longitud entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos o análogos de nucleótidos, preferentemente una longitud entre aproximadamente 12 y aproximadamente 80 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50, más preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 nucleótidos o análogos de nucleótidos; y/o

40 - el agente antisentido es un oligonucleótido 2'-O-metilfosforotioato o más preferentemente un oligonucleótido de fosforodiamidato morfolino; y/o

- el agente antisentido está conjugado con un péptido penetrador de células (PPC).

45 (v) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i) a (iv) anteriores, en el que el elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm *DUX4* o de *DUX4c* se selecciona del grupo que comprende sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme, segmentos ricos en pirimidina o polipirimidina aguas arriba de sitios aceptores de corte y empalme, límites de exón-intrón, límites de intrón-exón, sitios ramificados y elementos potenciadores de corte y empalme exónico del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c*, preferentemente seleccionados del grupo que comprenden sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme, límites de exón-intrón y límites de intrón-exón del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c*.

50 (vi) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i), (ii), (iv) o (v) anteriores configurado para unirse a al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente a al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente a al menos aproximadamente 25 bases o a al menos aproximadamente 30 bases, tales como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, preferentemente en el que dicha referencia a las bases indica bases consecutivas, de una cualquiera de las siguientes secuencias de pre-ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8) o de sus variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas:

ggctctgctggaggagcttaggacgcgggggtgggacggggctcgggtggtcggggcag (SEQ ID NO: 2);

65 gctgaccggcctgggattcctcctctaggtctaggcccggtgagagactccacaccgc (SEQ ID NO: 4);

## ES 2 596 977 T3

ggcatccccgggatcccagagccggcccagggtacctgcgccacgcgcggtttgctggggcag (SEQ ID NO: 6);

tctgtctgtctttgccgcttctggttagacctgcgcgagtgcgacccccggctgacg (SEQ ID NO: 8).

5 (vii) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i), (ii) o (iv) a (vi) anteriores que comprende una secuencia complementaria a una cualquiera de las siguientes secuencias de pre-ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 10 a 15, 66) o a sus variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o con sus fragmentos que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a las bases indica bases consecutivas de las secuencias o variantes respectivas:

15 cttctaggtctaggcccgggtgagag (SEQ ID NO: 10);

tggtagacctgcgcgagtgcgca (SEQ ID NO: 11);

cttctggttagacctgcgcgagtg (SEQ ID NO: 12);

20 agacctgcgcgagtgcgacccccg (SEQ ID NO: 13);

cttctggttagacctgcgcgagtgcgca (SEQ ID NO: 14);

gcccgttctggttagacctgcgcgagtg (SEQ ID NO: 15);

25 acgccccgggtgggacggggtcggt (SEQ ID NO: 66).

(viii) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i), (ii) o (iv) a (vii) que comprende una cualquiera de las secuencias (SEQ ID NO: 16 a 21, 64) o sus variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o sus fragmentos, que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a las bases indica bases consecutivas de las secuencias o variantes respectivas:

CUCUCACCGGGCCUAGACCUAGAAG (SEQ ID NO: 16);

UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCA (SEQ ID NO: 17);

40 ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 18);

CGGGGUGCGCACUGCGCGCAGGUCU (SEQ ID NO: 19);

45 UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 20);

ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAGCGGGC (SEQ ID NO: 21);

ACCCGACCCCGUCCCAACCCGCGU (SEQ ID NO: 64).

50 (ix) El agente antisentido de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i), (ii), (iv) o (ix) anteriores, en el que el elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c* es una señal de poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c*.

55 (x) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i), (ii) o (iv) o (ix) anteriores configurado para unirse a al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente a al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente a al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente a al menos aproximadamente 25 bases o a al menos aproximadamente 30 bases, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, preferentemente en el que dicha referencia a las bases indica bases consecutivas, de la siguiente secuencia de pre-ARNm de *DUX4* o *DUX4c* (SEQ ID NO: 67) o de sus variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia:

65 acatctctggtgattagttcagagatatataaaatgccccctcctgtggtatctatagaaga (SEQ ID NO: 67)

(ix) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i), (ii) o (iv), (ix) o (x) anteriores que comprende una secuencia complementaria a la siguiente secuencia de pre-ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 69) o a sus variantes que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos de aproximadamente 95 % con dicha secuencia o con sus fragmentos que comprende al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a las bases indica bases consecutivas de dichas secuencias o variantes:

agttcagagatatattaaatgccc (SEQ ID NO: 69).

(xii) El agente antisentido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (i), (ii) o (iv) o (ix) a (xi) anteriores que comprende la secuencia (SEQ ID NO: 65) o sus variantes que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia o con sus fragmentos, que comprende al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a las bases indica bases consecutivas de dicha secuencia o variantes:

GGGCAUUUUAAUAUAUCUCUGAACU (SEQ ID NO: 65).

(xiii) Un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores, o una construcción o vector de ácido nucleico recombinante, preferentemente una construcción o vector de expresión, que comprende un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores, para su uso como un medicamento.

(xiv) Una célula hospedadora que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores o el ácido nucleico como se define en el punto (xiii) anterior o la construcción o el vector como se define en el punto (xiii) anterior para su uso como un medicamento.

(xv) Un organismo hospedador no humano que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores o el ácido nucleico como se define en el punto (xiii) anterior o la construcción o el vector como se define en el punto (xiii) anterior o la célula hospedadora como se define en el punto (xiv) anterior.

(xvi) Una composición o formulación que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores o el ácido nucleico como se define en el punto (xiii) anterior o la construcción o el vector como se define en el punto (xiii) anterior o la célula hospedadora como se define en el punto (xiv) anterior, preferentemente en el que la composición o formulación es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso como un medicamento.

(xvii) Una composición o formulación farmacéutica que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores o el ácido nucleico como se define en el punto (xiii) anterior o la construcción o el vector como se define en el punto (xiii) anterior o la célula hospedadora como se define en el punto (xiv) anterior, y que adicionalmente comprende uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

(xviii) Un kit de componentes que comprende la composición o formulación farmacéutica como se define en el punto (xvii) anterior.

(xix) Uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores o el ácido nucleico como se define en el punto (xiii) anterior o la construcción o el vector como se define en el punto (xiii) anterior o la célula hospedadora como se define en el punto (xiv) anterior, o la composición o formulación como se define en el punto (xvi) anterior para su uso en el tratamiento de distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) o para su uso en el tratamiento de un sarcoma que comprende la expresión de una proteína de fusión entre *DUX4* o *DUX4c* y otra proteína no relacionada.

(xx) Uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en uno cualquiera de los puntos (i) a (xii) anteriores o el ácido nucleico como se define en el punto (xiii) anterior o la construcción o el vector como se define en el punto (xiii) anterior o la célula hospedadora como se define en el punto (xiv) anterior, o la composición o formulación como se define en el punto (xvi) anterior para su uso en el tratamiento de acuerdo con el punto (xix), en el que el sarcoma se selecciona de la familia de tumores de Ewing, sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados y rhabdomyosarcomas.

Por tanto, la materia objeto proporcionada por la invención pertenece específicamente a la divulgación, descripción y explicación de la presente memoria descriptiva.

Los autores de la invención supusieron que la regulación negativa de la expresión de la doble homeocaja 4 y/o de la doble homeocaja 4c podía contrarrestar sus efectos patológicos y permitir que se produjese la regeneración muscular en pacientes con FSHD. Los autores de la invención supusieron adicionalmente que la regulación negativa de la expresión de la doble homeocaja 4 y/o de la doble homeocaja 4c podía contrarrestar la actividad transcripcional potenciada de las proteínas de fusión que contuviesen DUX4, que se observan determinados tumores, particularmente en determinados tipos de sarcomas, y por lo tanto tener un beneficio terapéutico, por ejemplo, retrasar la formación y/o progresión de dichos tumores.

Habiendo realizado exhaustivos ensayos los autores de la invención se percataron de que los agentes antisentido que se dirigen a elementos de secuencia implicados en el corte y empalme de transcritos de *DUX4* o *DUX4c* podían reducir o anular la producción de las proteínas respectivas. Este hallazgo es inesperado, ya que los agentes antisentido que se dirigen a elementos de secuencia necesarios para el corte y empalme se contemplaron previamente para la omisión de exones terapéuticos para restablecer, al menos parcialmente, la funcionalidad de proteínas defectuosas, tal como, por ejemplo, retirar mutaciones sin sentido o reestablecer la fase de lectura alterada por deleciones o duplicaciones genómicas en el gen de la distrofina en la distrofia muscular de Duchenne (DMD) Wilton *et al.* 2007 (Mol Ther 15(7): 1288-96); Adams *et al.* 2007 (BMC Mol Biol 8: 57)). Además, los intrones del transcrito de *DUX4* se localizan en su región no traducida 3' (UTR 3'), que es inusual, y por lo tanto no se esperaba que la interferencia con el corte y empalme alterase la secuencia codificante de *DUX4* o la producción de la proteína DUX4.

Los autores de la invención también se percataron de que los agentes antisentido que se dirigen a elementos de secuencia implicados en la poliadenilación de transcritos de *DUX4* o *DUX4c* pueden reducir o anular la producción de las proteínas respectivas.

Por tanto, la memoria descriptiva describe en líneas generales un agente antisentido capaz de reducir o anular la producción de las proteínas DUX4 o DUX4c. Un agente antisentido como el indicado en el presente documento puede ser capaz de unirse a (aparearse con) genes *DUX4* o *DUX4c*. En particular, dicho agente antisentido puede ser capaz de unirse a (aparearse con) una región de secuencia en la secuencia (pre-ARNm) de *DUX4* o *DUX4c*.

La doble homeocaja 4 emerge como particularmente implicada en la etiología de la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD). Por tanto, en el presente documento se desvela preferentemente: un agente antisentido capaz de reducir o anular la producción de la proteína DUX4; un agente antisentido capaz de unirse a un gen *DUX4*; un agente antisentido capaz de unirse a una región de la secuencia en la secuencia (pre-ARNm) de *DUX4*.

En el presente documento también se desvela preferentemente: un agente antisentido capaz de reducir o anular la producción de la proteína DUX4 pero no la de la proteína DUX4c; un agente antisentido capaz de unirse al gen *DUX4* pero no al gen *DUX4c*; un agente antisentido capaz de unirse a una región de la secuencia en la secuencia (pre-ARNm) de *DUX4* pero no a una región de la secuencia en la secuencia (pre-ARNm) de *DUX4c*.

En una alternativa, en el presente documento se desvela: un agente antisentido capaz de reducir o anular la producción de la proteína DUX4c pero no la de la proteína DUX4; un agente antisentido capaz de unirse al gen *DUX4c* pero no al gen *DUX4*; un agente antisentido capaz de unirse a una región de la secuencia en la secuencia (pre-ARNm) de *DUX4c* pero no a una región de la secuencia en la secuencia (pre-ARNm) de *DUX4*.

La memoria descriptiva describe preferentemente un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme de genes de la doble homeocaja 4 (*DUX4*) o de la doble homeocaja 4c (*DUX4c*) (como se explica en cualquier parte en esta memoria descriptiva, una mención del corte y empalme o del corte y empalme de un gen generalmente se refiere al corte y empalme de un pre-ARNm de un gen para retirar una o más secuencias intervinientes). El agente antisentido puede reducir o anular la producción de las proteínas DUX4 o DUX4c respectivas. Por ejemplo, y sin ligarse a ninguna teoría, dichos agentes antisentido podrían interferir con el corte y empalme de los genes (pre-ARNm) *DUX4* o *DUX4c* o podrían actuar a través de otro mecanismo.

La doble homeocaja 4 emerge como particularmente implicada en la etiología de la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD). Por tanto, en el presente documento se desvela preferentemente un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del gen de la doble homeocaja 4 (*DUX4*). El agente antisentido puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4.

En el presente documento también se desvela preferentemente un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del gen *DUX4* pero no para el del gen *DUX4c*. El agente antisentido puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4 pero no reducir o anular la producción de la proteína DUX4c. En una alternativa, se desvela un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del gen *DUX4c* pero no para el del gen *DUX4*. El agente antisentido puede reducir o

anular la producción de la proteína DUX4c pero no reducir o anular la producción de la proteína DUX4.

Los elementos de secuencia necesarios para el corte y empalme de los genes *DUX4* o *DUX4c* como los propuestos particularmente en el presente documento, indican elementos de secuencias en *cis*, es decir, los localizados dentro de dichos genes *DUX4* o *DUX4c*, respectivamente.

Los elementos de secuencia que van a ser dirigidos por (es decir, seleccionados para unirse mediante) los agentes antisentido como se desvela en el presente documento pueden seleccionarse preferentemente del grupo que comprende o consta de sitios donantes de corte y empalme (es decir, sitios de corte y empalme 5'), sitios aceptores de corte y empalme (es decir, sitios de corte y empalme 3'), segmentos ricos en pirimidina o polipirimidina aguas arriba de (es decir, con respecto a 5') sitios aceptores de corte y empalme, límites de exón-intrón, límites de intrón-exón, sitios ramificados y elementos potenciadores de corte y empalme exónico de los genes *DUX4* o *DUX4c*. Los sitios donantes de corte y empalme y los sitios aceptores de corte y empalme, límites de exón-intrón y límites de intrón-exón son de fácil acceso para el direccionamiento y pueden por tanto constituir elementos de secuencia preferidos en el presente documento. Adicionalmente, los agentes antisentido particularmente efectivos como se describe en el presente documento, incluyen los que son capaces de unirse a sitios aceptores de corte y empalme o a límites de intrón-exón de los genes *DUX4* o *DUX4c*.

En el presente documento se desvelan agentes antisentido que pueden unirse preferentemente a un elemento de secuencia completo necesario para el corte y empalme de *DUX4* o *DUX4c* (es decir, pueden solaparse por completo con o emparejarse por completo con dicho elemento de secuencia). Como alternativa, los agentes antisentido como se desvela en el presente documento pueden unirse a una o más porciones de un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme de *DUX4* o *DUX4c* (por ejemplo, pueden solaparse parcialmente con o emparejarse parcialmente con dicho elemento de secuencia).

La referencia a "unión a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme" también incluye agentes antisentido que se unen en una posición suficientemente cercana a dicho elemento. Por ejemplo, los agentes antisentido pueden unirse en una posición suficientemente cercana a dicho elemento para alterar la unión y función de la maquinaria de corte y empalme que normalmente podría actuar como mediadora para que se produzca una reacción de corte y empalme particular en ese elemento (por ejemplo, dichos agentes pueden unirse a un pre-ARNm en una posición que incluye aproximadamente 3, aproximadamente 6 o aproximadamente 9 bases, de dicho elemento).

La memoria descriptiva también describe preferentemente un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación de los genes *DUX4* o *DUX4c* (como se explica en cualquier parte de esta memoria descriptiva, una mención de poliadenilación o poliadenilación de un gen generalmente se refiere a poliadenilación de un pre-ARNm de un gen). El agente antisentido puede reducir o anular la producción de las proteínas DUX4 o DUX4c. Por ejemplo, y sin querer ligarse a ninguna teoría, dichos agentes antisentido podrían interferir con la poladenilación de los genes (pre-ARNm) *DUX4* o *DUX4c* o podrían actuar a través de otro mecanismo.

La doble homeocaja 4 emerge como particularmente implicada en la etiología de FSHD. Preferentemente, en el presente documento se desvela por tanto un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del gen *DUX4*. El agente antisentido puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4.

En el presente documento también se desvela preferentemente un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del gen *DUX4* pero no para la del gen *DUX4c*. El agente antisentido puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4 pero no reducir o anular la producción de la proteína DUX4c. En una alternativa, se desvela un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del gen *DUX4c* pero no para la gen *DUX4*. El agente antisentido puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4c pero no puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4.

En el presente documento también se desvela preferentemente un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del gen *DUX4* pero no capaz de unirse al gen *DUX4c*. El agente antisentido puede reducir o anular una reproducción de la proteína DUX4 pero no reducir o anular la producción de la proteína DUX4c. En una alternativa, se desvela un agente antisentido capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del gen *DUX4c* pero no capaz de unirse al elemento de secuencia del gen *DUX4*. El agente antisentido puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4c pero no puede reducir o anular la producción de la proteína DUX4.

Los elementos de secuencia necesarios para la poliadenilación de los genes *DUX4* o *DUX4c*, como se pretende particularmente en el presente documento, representan elementos de secuencia en *cis*, es decir, los localizados dentro de dichos genes *DUX4* o *DUX4c*, respectivamente.

Los elementos de secuencia que va a ser dirigidos por (es decir, seleccionarse para unirse mediante) agentes antisentido capaces de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación de los genes *DUX4* o *DUX4c*, pueden ser preferentemente señales de poliadenilación (tal como más preferentemente la señal de poliadenilación ATTTAAA) de los genes *DUX4* o *DUX4c*.

Los agentes antisentido capaces de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación de los genes *DUX4* o *DUX4c* pueden preferentemente unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación de *DUX4* o *DUX4c* (es decir, pueden solapar completamente con o emparejarse completamente con dicho elemento de secuencia). Como alternativa, los agentes antisentido capaces de unirse a un elemento de secuencia necesarios para la poliadenilación de los genes *DUX4* o *DUX4c* pueden unirse a una o más porciones de un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación de *DUX4* o *DUX4c* (por ejemplo, pueden solapar parcialmente con o emparejarse parcialmente con dicho elemento de secuencia).

La referencia a "unión a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación" también incluye agentes antisentido que se unen en una posición suficientemente cercana a dicho elemento (por ejemplo, dichos agentes pueden unirse a un pre-ARNm en una posición que incluye aproximadamente 3, aproximadamente 6, o aproximadamente 9 bases de dicho elemento).

Los agentes antisentido, como se pretende en el presente documento, comprenden o representan, preferentemente, moléculas antisentido tales como preferentemente moléculas de ácido nucleico antisentido o moléculas análogas de ácido nucleico antisentido. Preferentemente, los agentes antisentido pueden referirse a oligonucleótidos antisentido o a análogos de oligonucleótidos antisentido. Como un ejemplo y sin limitación, dichos agentes o moléculas antisentido pueden tener una longitud de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos o análogos de nucleótidos, preferentemente una longitud entre aproximadamente 12 y aproximadamente 80 nucleótidos o análogos de nucleótidos, también preferentemente una longitud entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos o análogos de nucleótidos, más preferentemente una longitud entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 (tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30) nucleótidos o análogos de nucleótidos.

En el presente documento se desvelan preferentemente agentes antisentido que incluyen moléculas análogas de ácido nucleico antisentido, tal como, por ejemplo, análogos de oligonucleótidos antisentido, más preferentemente análogos de oligonucleótidos antisentido que comprenden un esqueleto de 2'-O-metil fosforotioato o más preferentemente análogos de oligonucleótido antisentido que comprenden un esqueleto de morfolino fosforodiamidato, como se ilustra esquemáticamente en las Figuras 24 y 25, respectivamente. Los oligómeros de morfolino fosforodiamidato modificadores de corte y empalme se han empleado satisfactoriamente para restablecer la expresión de la distrofina en la DMD, validando de este modo su química oligonucleotídica (Kinali *et al.* 2009 (Lancet Neurol 8: 918-28)).

Ventajosamente, un agente antisentido como se desvela en el presente documento puede conjugarse con un péptido penetrador de células (PPC) para potenciar la captación celular de dichos agentes antisentido.

Adicionalmente mediante un ejemplo y sin limitación, dichos agentes o moléculas antisentido pueden configurarse para unirse con (emparejarse con) una región de secuencia, más particularmente una región en la secuencia (pre-ARNm) de *DUX4* o *DUX4c*, donde dicha región tiene una longitud de al menos aproximadamente 10 nucleótidos, preferentemente al menos una longitud de 12 nucleótidos, también preferentemente de al menos aproximadamente 15 nucleótidos, más preferentemente de al menos aproximadamente 20 nucleótidos, incluso más preferentemente de al menos aproximadamente 25 o de al menos aproximadamente 30 nucleótidos, tal como, por ejemplo, una longitud entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos, preferentemente entre aproximadamente 12 y aproximadamente 80 nucleótidos, también preferentemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50 nucleótidos y más preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 (tal como, por ejemplo, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30) nucleótidos, donde la referencia a nucleótidos puede representar preferentemente nucleótidos consecutivos.

Un gen *DUX4* preferentemente destinado para dirigirse por los agentes antisentido como se desvela en el presente documento reside en la unidad D4Z4 más distal que se extiende en la región flanqueante *pLAM* del lado telomérico de la matriz D4Z4. Dicho gen *DUX4* conduce la producción de uno o más ARNm comparativamente estables (Dixi *et al.* 2007, citado anteriormente). Como se ilustra esquemáticamente en la Figura 2, en lo que se refiere a una secuencia genómica ejemplar pero no limitante, como se muestra en la Figura 3, dicho gen *DUX4* comprende dos intrones que se localizan en su UTR 3', particularmente el intrón 1 (o intrón A) dentro de la unidad D4Z4 y el intrón 2 (o intrón A) proporcionado por la región *pLAM*. Dicho gen *DUX4* comprende adicionalmente una señal de poliadenilación ATTTAAA localizada dentro de la región *pLAM*.

Un gen *DUX4*, como se pretende en el presente documento, que también puede representar una unidad de transcripción de *DUX4* que abarca varias unidades D4Z4, puede presentar corte y empalme alternativo y puede comprender la región *pLAM*, en particular, como desvelan Snider *et al.* 2009, citado anteriormente. Como se ilustra esquemáticamente en las Figuras 26 y 28, dichos transcritos de *DUX4* pueden comprender el intrón 1, el intrón 1 bis

o el intrón 2a en la unidad D4Z4, el intrón 2 proporcionado por la región *pLAM* o el intrón 2a bis proporcionado por la unidad D4Z4 y la región *pLAM*. Dicho transcrito de *DUX4* comprende adicionalmente una señal de poliadenilación ATAAA localizada dentro de la región *pLAM*.

5 Por tanto, los elementos de secuencia que van a dirigir los agentes antisentido anti-*DUX4* como se desvela en el presente documento, particularmente los elementos de secuencia necesarios para el corte y empalme del gen *DUX4* que van a dirigir los agentes antisentido anti-*DUX4* capaces de unirse a dichos elementos, incluyen preferentemente aquellos elementos de secuencia (tales como, por ejemplo, sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme, límites de exón-intrón, límites de intrón-exón, segmentos ricos en pirimidina o polipirimidina, sitios ramificados y/o elementos potenciadores de corte y empalme exónico) necesarios para la retirada de dicho intrón 1, intrón 1 bis, intrón 2, intrón 2a o intrón 2a bis (preferentemente del intrón 1 o 2) de *DUX4* después del corte y empalme de un gen *DUX4*. Preferentemente, los elementos de secuencia de *DUX4* dirigidos pueden seleccionarse del grupo que comprende o que consta de sitios donantes de corte y empalme de dicho intrón 1, intrón 1 bis, intrón 2, intrón 2a o intrón 2a bis (preferentemente del intrón 1 o 2) de *DUX4* y sitios aceptores de corte y empalme de dicho intrón 1, intrón 1 bis, intrón 2, intrón 2a o intrón 2a bis (preferentemente del intrón 1 o 2) de *DUX4*; más preferentemente del grupo que comprende o que consta de sitios aceptores de corte y empalme de dicho intrón 1, intrón 1 bis, intrón 2, intrón 2a o intrón 2a bis (preferentemente del intrón 1 o 2) de *DUX4*; incluso más preferentemente puede ser el sitio aceptor de corte y empalme de dicho intrón 2 de *DUX4*.

20 Los elementos de secuencia que van a dirigir los agentes antisentido anti-*DUX4* como se desvela en el presente documento, particularmente los elementos de secuencia necesarios para la poliadenilación del gen *DUX4* y que van a dirigir los agentes antisentido anti-*DUX4* capaces de unirse a dichos elementos, incluyen preferentemente la señal de poliadenilación ATAAA.

25 Como se muestra en una secuencia genómica ejemplar, pero no limitante, del gen *DUX4c* (número de registro de Genbank AY500824, versión de secuencia 1, es decir, AY500824.1), la ORF que codifica la proteína *DUX4c* se encontró en las posiciones 918-2042 de AY500824.1 y no está alterada por intrones. Sin embargo, una secuencia genómica ejemplar, pero no limitante, más larga del gen *DUX4c* (número de registro de Genbank NC\_000004, versión de secuencia 11, es decir, NC\_000004.11, intervalo 190940254..190945505 complemento) indica que la ORF de *DUX4c* puede incluirse dentro de un transcrito de *DUX4c* más largo que contiene seis supuestos exones (indicados como exones 1 a 6) en posiciones respectivamente 1-65, 617-741, 966-1160, 1385-2945, 4034-4154 y 4911-5251 de NC\_000004.11 (intervalo 190940254..190945505, complemento) (en el que el supuesto exón 4 contiene la ORF de *DUX4c*) y que corresponde a cinco supuestos intrones (indicados como intrones 1 a 5) en las posiciones 66-616, 742-965, 1161-1384, 2946-4033 y 4155-4910 de NC\_000004.11 (intervalo 190940254..190945505, complemento).

40 Por tanto, los elementos de secuencia que van a dirigir los agentes antisentido anti-*DUX4c* como se desvela en el presente documento, particularmente elementos de secuencia necesarios para el corte y empalme del gen *DUX4c* a dirigir por los agentes antisentido anti-*DUX4c* capaces de unirse a dichos elementos, incluyen preferentemente aquellos elementos de secuencia (tales como, por ejemplo, sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme, límites exón-intrón, límites intrón-exón, segmentos ricos en pirimidina o polipirimidina, sitios ramificados y/o elementos potenciadores de corte y empalme exónico) necesarios para la retirada de dichos intrones de *DUX4c*, por ejemplo, intrones 1, 2, 3, 4 o 5 de *DUX4c* después del corte y empalme de dicho *DUX4c*. Preferentemente, los elementos de secuencia de *DUX4c* dirigidos pueden seleccionarse del grupo que comprende o consta de sitios donantes de corte y empalme de dichos intrones 1, 2, 3, 4 o 5 de *DUX4c* y sitios aceptores de corte y empalme de dichos intrones 1, 2, 3, o 5 de *DUX4c*; más preferentemente del grupo que comprende o consta de sitios aceptores de corte y empalme de dichos intrones 1, 2, 3, 4 o 5 de *DUX4c*.

50 Sin limitación, cuando un elemento de secuencia diana es un sitio donante de corte y empalme en genes *DUX4* o *DUX4c*, un agente antisentido como se desvela en el presente documento puede configurarse para unirse a una región en la secuencia de *DUX4* o *DUX4c* correspondiente a las posiciones de aproximadamente +30 a aproximadamente -30, preferentemente de aproximadamente +25 a aproximadamente -25, más preferentemente de aproximadamente +20 a aproximadamente -20 con respecto al límite exón-intrón respectivo (es decir, la posición +1 indica la última base del exón precedente y la posición -1 indica la primera base del siguiente intrón). En particular, un agente antisentido puede configurarse para unirse con (emparejarse con) al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases o al menos aproximadamente 30 bases, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases en una cualquiera de las regiones anteriormente citadas en la secuencia de *DUX4* o *DUX4c*, en el que dicha referencia a las bases puede representar preferentemente bases consecutivas. Preferentemente, dicha unión (emparejamiento) implicará al menos las posiciones -1 o -2 (más preferentemente ambas posiciones -1 y -2) y/o las posiciones +1 o +2 (más preferentemente ambas posiciones +1 y +2) con respecto al límite exón-intrón respectivo. Por ejemplo, dicha unión (emparejamiento) puede implicar al menos las posiciones +1 a -1 o +1 a -2 o +2 a -1 o +2 a -2. Estas posiciones representan bases que están unen el límite exón-intrón respectivo y que son particularmente relevantes para el corte y empalme. Por tanto, y sin limitación, un agente antisentido puede configurarse para unirse a una cualquiera de las regiones citadas anteriormente en la secuencia de *DUX4* o *DUX4c* de tal modo que se

5 empareja sobre (es decir, abarca o atraviesa) el límite exón-intrón respectivo y forma pares de bases con al menos 1 base, preferentemente con al menos 2 bases, más preferentemente con al menos 5 bases e incluso más preferentemente con al menos 7 o al menos 10 bases en cada lado de dicho límite exón-intrón, tal como con entre 1 y aproximadamente 20 bases, preferentemente entre 2 y aproximadamente 15 bases o entre 2 y aproximadamente 10 bases en cada lado de dicho límite exón-intrón.

10 Sin limitación, cuando un elemento secuencia diana es un sitio aceptor de corte y empalme en los genes *DUX4* o *DUX4c*, un agente antisentido, como se desvela en el presente documento, puede configurarse para unirse a una región en la secuencia de *DUX4* o *DUX4c* correspondiente a las posiciones de aproximadamente -30 a aproximadamente +30, preferentemente de aproximadamente -25 a aproximadamente +25, más preferentemente aproximadamente -20 a aproximadamente +20 con respecto al límite intrón-exón respectivo (es decir, la posición -1 indica la última base del intrón precedente y la posición +1 indica la primera base del siguiente intrón). En particular, un agente antisentido puede configurarse para unirse a (emparejarse con) al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases o al menos aproximadamente 30 bases, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, en una cualquiera de las regiones citadas anteriores en la secuencia de *DUX4* o *DUX4c*, en el que dicha referencia a bases puede representar preferentemente bases consecutivas. Preferentemente, dicha unión (emparejamiento) implicará al menos las posiciones -1 o -2 (más preferentemente ambas posiciones -1 y -2) y/o las posiciones +1 o +2 (más preferentemente ambas posiciones +1 y +2) con respecto al límite intrón-exón respectivo. Por ejemplo, dicha unión (emparejamiento) puede implicar al menos las posiciones -1 a +1 o -1 a +2 o -2 a +1 o -2 a +2. Estas posiciones representan bases que unen el límite intrón-exón respectivo y que son particularmente relevantes para el corte y empalme. Por tanto, y sin limitación, un agente antisentido puede configurarse para unirse a una cualquiera de las regiones anteriormente citadas en la secuencia de *DUX4* o *DUX4c* de tal manera que se empareja sobre (es decir, abarca o cruza) el límite intrón-exón respectivo y forma pares de bases con al menos 1 base, preferentemente al menos 2 bases, más preferentemente al menos 5 bases e incluso más preferentemente al menos 7 o al menos 10 bases en cada lado de dicho límite intrón-exón, tal como con entre 1 y aproximadamente 20 bases, preferentemente entre 2 y aproximadamente 15 bases o entre 2 y aproximadamente 10 bases en cada lado de dicho límite intrón-exón.

30 En un ejemplo, un agente antisentido anti-*DUX4* puede configurarse para unirse a (emparejarse con) al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases o al menos aproximadamente 30 bases, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de una cualquiera de las siguientes secuencias de *DUX4* (SEQ ID NO: 2 a 9) o de sus variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas:

40 *ggctctgctggaggagcttaggacgcggg|gtgggncggggtcgggtggtcggggcag* (SEQ ID NO: 2; posiciones +30 a -30 de un límite exón 1 – intrón 1 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

45 *gaggagcttaggacgcggg|gtgggacggggtcgggtg* (SEQ ID NO: 3; posiciones +20 a -20 de un límite exón 1 – intrón 1 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

50 *gctgaccggcctgggattcctcttag|gtctaggcccggtagagactccacaccgc* (SEQ ID NO: 4; posiciones -30 a +30 de un límite intrón 1 – exón 2 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

55 *ctgggattcctgcctcttag|gtctaggcccggtagagac* (SEQ ID NO: 5; posiciones -20 a +20 de un límite intrón 1 – exón 2 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

60 *ggcatcccggggatcccagagccggcccag|gtacctgcgcacgcgggttgccgggcag* (SEQ ID NO: 6; posiciones +30 a -30 de un límite exón 2 – intrón 2 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

65 *ggatcccagagccggcccag|gtacctgcgcacgcgggt* (SEQ ID NO: 7; posiciones +20 a -20 de un límite exón 2 – intrón 2 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

70 *tctgtctgtcttggccgcttctggctag|acctgcgcagctgcgcaccccgctgacg* (SEQ ID NO: 8; posiciones -30 a +30 de un límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva).

75 *ttgcccgcttctggctag|acctgcgcagctgcgcacc* (SEQ ID NO: 9; posiciones -20 a +20 de un límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva).

80 Preferentemente, el agente antisentido anti-*DUX4* puede emparejarse sobre (es decir, abarcar o atravesar) los límites exón-intrón o intrón-exón respectivos encontrados en la SEQ ID NO: 2 a 9 o en sus variantes (indicado con el símbolo “|” anterior). También preferentemente, el agente antisentido anti-*DUX4* puede emparejarse con al menos

una y preferentemente con las dos bases intrónicas (indicadas anteriormente en cursiva y negrita) adyacentes a los límites exón-intrón o intrón-exón respectivos y/o (preferentemente “y”) con al menos una y preferentemente ambas de las dos bases exónicas (subrayadas anteriormente) adyacentes a los límites exón-intrón o intrón-exón respectivos.

5 En ejemplos no limitantes, un agente antisentido anti-*DUX4* eficaz puede configurarse para unirse a (emparejarse con) una cualquiera de las siguientes secuencias de *DUX4* (SEQ ID NO: 10 a 15, 66) o sus variantes, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 %, y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o con sus fragmentos que comprenden  
10 al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de las secuencias o variantes respectivas. Más específicamente, dicho agente antisentido anti-*DUX4* puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia  
15 análoga de ácido nucleico) complementaria a una cualquiera de dichas secuencias de *DUX4* SEQ ID NO: 10 a 15, 66 o sus variantes, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 %, y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o con sus fragmentos que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más  
20 preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de las secuencias o variantes respectivas:

25 *cttctaggcttaggcccggtagag* (SEQ ID NO: 10; posiciones -7 a +18 de un límite intrón 1 – exón 2 de *DUX4* ejemplar; posiciones 12241-12265 de la secuencia de Genbank AF117653.2 (véase la Figura 3); la secuencia intrónica se indica en cursiva);

*tgctagacctgcgcgagcagcgcga* (SEQ ID NO: 11; posiciones -7 a +18 de un límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4* ejemplar; posiciones 12678-12702 de AF117653.2; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

30 *cttcctggctagacctgcgcgagcagcgcga* (SEQ ID NO: 12; posiciones -12 a +13 de un límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4* ejemplar; posiciones 12673-12697 de AF117653.2; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

35 *agacctgcgcgagcagcgcaccccg* (SEQ ID NO: 13; posiciones -2 a +23 de un límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4* ejemplar; posiciones 12685-12703 de AF117653.2; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

*cttcctggctagacctgcgcgagcagcgcga* (SEQ ID NO: 14; posiciones -12 a +18 de un límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4* ejemplar; posiciones 12673-12702 de AF117653.2; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

40 *gcccgttcctggctagacctgcgcgagcagcgcga* (SEQ ID NO: 15; posiciones -17 a +13 de un límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4* ejemplar; posiciones 12668-12697 de AF117653.2; la secuencia intrónica se indica en cursiva).

*acgcgggggtgggacggggtcgggt* (SEQ ID NO: 66; posiciones +7 a -18 de un límite exón 1 – intrón 1 de *DUX4* ejemplar; posiciones 12105-12129 de AF117653.2; la secuencia intrónica se indica en cursiva).

45 Por ejemplo, en el presente documento se desvelan agentes antisentido anti-*DUX4* que comprenden, constan esencialmente de o constan de una cualquiera de las secuencias (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias análogas de ácido nucleico) SEQ ID NO: 16 a 21, 64 o sus variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o sus fragmentos, que comprenden al menos 10 bases, o al  
50 menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de las secuencias o variantes respectivas:

55 CUCUCACCGGGCCUAGACCUAGAAG (SEQ ID NO: 16);

UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCA (SEQ ID NO: 17);

ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 18);

60 CGGGUGCGCACUGCGCGCAGGUCU (SEQ ID NO: 19);

UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 20);

ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAGCGGGC (SEQ ID NO: 21);

65 ACCCGACCCCGUCCCAACCCCGCGU (SEQ ID NO: 64);

## ES 2 596 977 T3

en las que U representa uracilo (que opcionalmente puede reemplazarse por timina, T). En particular, los agentes antisentido anti-*DUX4* comprenden, constan esencialmente de o constan de una cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 16 a 21, 64 o las variantes o fragmentos de las mismas presentan complementariedad con, y por tanto están configuradas para unirse a (emparejarse con), las secuencias de *DUX4* anteriores SEQ ID NO: 10 a 15, 66 o con sus variantes o fragmentos.

En un ejemplo, un agente antisentido anti-*DUX4c* puede configurarse para unirse a (emparejarse con) al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases o al menos aproximadamente 30 bases, de tal manera que entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de una cualquiera de las siguientes secuencias de *DUX4c* (SEQ ID NO: 22 a 41) o de sus variantes que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 %, y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas:

acctccccacagcccacagctcttgcata | *gtgcggaatagttctactacagga* (SEQ ID NO: 22; posiciones +30 a -30 de un supuesto límite exón 1 - intrón 1 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 36-95 de la secuencia GenBank NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

agcccacagctcttgcata | *gtgcggaatagttctat* (SEQ ID NO: 23; posiciones +20 a -20 de dicho límite exón 1 - intrón 1 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

gcagagaggaagcggcttccgctccag | *ggccagcgggacctcgactccgggaaaac* (SEQ ID NO: 24; posiciones -30 a +30 de un supuesto límite exón 1 - intrón 2 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 587-646 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

aagcggcttccgctccag | *ggccagcgggacctcgact* (SEQ ID NO: 25; posiciones -20 a +20 de dicho intrón 1 – exón 2 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

gctcaccagcctccggatcgccggccgg | *gtcacttccggagcaattcggagcaa* (SEQ ID NO: 26; posiciones +30 a -30 de un supuesto límite exón 2 - intrón 2 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 712-771 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

cctccggatcgccggccgg | *gtcacttccggagcaa* (SEQ ID NO: 27; posiciones +20 a -20 de dicho límite exón 2 - intrón 2 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

cgggttccagctccttgcctctgcaag | *gggacgtgtgctcgctgctcccggccc* (SEQ ID NO: 28; posiciones -30 a +30 de un supuesto límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 936-995 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

gctccttgcctctgcaag | *ggacgtgtgctcgctgt* (SEQ ID NO: 29; posiciones -20 a +20 de dicho límite intrón 2 – exón 3 de *DUX4c* ejemplar 2; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

ttgcagaaacaggaatccgtggtcagcc | *gtgatgcacccgacgttcttctgca* (SEQ ID NO: 30; posiciones +30 a -30 de un supuesto límite exón 3 - intrón 3 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 1131-1190 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

caggaatccgtggtcagcc | *gtgatgcacccgacgttct* (SEQ ID NO: 31; posiciones +20 a -20 de dicho límite exón 3 - intrón 3 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

agtcaagacagcggcttccagttccatag | *aattactggagaacctcagagccagccc* (SEQ ID NO: 32; posiciones -30 a +30 de un supuesto límite intrón 3 – exón 4 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 1355-1414 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

gcggttccagttccatag | *aattactggagaacctcaga* (SEQ ID NO: 33; posiciones -20 a +20 de dicho límite intrón 3 - exón 4 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

gaagaacaccgggctctgctgaggagcag | *gttgagcggggtggggcggggggc* (SEQ ID NO: 34; posiciones +30 a -30 de un supuesto límite exón 4 - intrón 4 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 2916-2975 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

gggctctgctgaggagcag | *gttgagcggggtggggcg* (SEQ ID NO: 35; posiciones +20 a -20 de dicho límite exón 4 - intrón 4 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

ctggattccagtttcttgcctctgcaag | *aggtgcctgtgctcaagtctgccccg* (SEQ ID NO: 36; posiciones -30 a +30 de un supuesto límite intrón 4 - exón 5 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 3404-4063 de NC\_000004.11 intervalo

## ES 2 596 977 T3

190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

*cgtttcttgccctctgca***g***l*aggtgctgttgctcaagtc (SEQ ID NO: 37; posiciones -20 a +20 de dicho límite intrón 4 - exón 5 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

5 *ttccaggaatgctggaacaccagcatcgt* **g***tcggtgctctcctttccagtttcaaacag* (SEQ ID NO: 38; posiciones +30 a -30 de un supuesto límite exón 5 - intrón 5 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 4125-4184 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

10 *gctggaacaccagcatcgt* **g***tcggtgctctcctttccag* (SEQ ID NO: 39; posiciones +20 a -20 de dicho límite exón 5 - intrón 5 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

15 *ctgtccttgggtgctgtgggctgaaag***l***ttgtcgagtcgcccgtccctgtggtggga* (SEQ ID NO: 40; posiciones -30 a +30 de un supuesto límite intrón 5 - exón 6 de *DUX4c* ejemplar; posiciones 4881-4940 de NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento; la secuencia intrónica se indica en cursiva);

*ggtgctgtgggctgaaag***l***ttgtcgagtcgcccgtccc* (SEQ ID NO: 41; posiciones -20 a +20 de dicho límite intrón 5 - exón 6 de *DUX4c* ejemplar; la secuencia intrónica se indica en cursiva).

20 Preferentemente, el agente antisentido anti-*DUX4c* es capaz de emparejarse sobre (es decir, abarcar o atravesar) los límites exón-intrón o intrón-exón respectivos encontrados en SEQ ID NO: 22 a 41 o en las variantes de las mismas (indicado por el símbolo "l" anterior). También preferentemente, el agente antisentido anti-*DUX4c* es capaz de emparejarse con al menos una y preferentemente con las dos bases intrónicas (indicadas anteriormente en cursiva y negrita) adyacentes a los límites exón-intrón o intrón-exón respectivos y/o (preferentemente "y") con al menos una y preferentemente con las dos bases exónicas (subrayadas anteriormente) adyacentes a los límites exón-intrón o intrón-exón respectivos.

30 Sin limitación, cuando un elemento de secuencia diana es una señal de poliadenilación en el gen *DUX4* o *DUX4c*, tal como preferentemente la señal de poliadenilación ATTTAAA, un agente antisentido como se desvela en el presente documento puede configurarse para unirse a una región en la secuencia de *DUX4* o de *DUX4c* correspondiente a las posiciones de aproximadamente -30 a aproximadamente +30, preferentemente de aproximadamente -25 a aproximadamente +25, más preferentemente de aproximadamente -20 a aproximadamente +20, con respecto a dicha señal de poliadenilación (es decir, la posición -1 que indica la última base precedente a la señal de poliadenilación y la posición +1 que indica la primera base a continuación de la señal de poliadenilación). En particular, dicho agente antisentido puede configurarse para unirse a (emparejarse con) al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases o al menos aproximadamente 30 bases, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases en una cualquiera de las regiones anteriormente indicadas en la secuencia de *DUX4* o de *DUX4c*, en el que dicha referencia a las bases puede representar preferentemente bases consecutivas. Preferentemente, el agente antisentido puede configurarse para unirse de tal manera que se hibride con al menos una porción (por ejemplo,  $\geq 1$ ,  $\geq 2$ ,  $\geq 3$ ,  $\geq 4$ ,  $\geq 5$  o  $\geq 6$  nucleótidos) de la señal de poliadenilación o con toda la señal de poliadenilación. Por ejemplo, pero sin limitación, dicho agente antisentido puede configurarse para hibridarse sobre (es decir, abarcar o atravesar) la señal de poliadenilación y emparejarse con al menos 1 base, preferentemente con al menos 2 bases, más preferentemente con al menos 5 bases e incluso más preferentemente con al menos 7 o con al menos 10 bases en cada lado de dicha señal de poliadenilación, tal como entre 1 y aproximadamente 20 bases, preferentemente entre 2 y aproximadamente 15 bases o entre 2 y aproximadamente 10 bases en cada lado de dicha señal de poliadenilación.

50 En un ejemplo, un agente antisentido anti-*DUX4* puede configurarse para unirse a (emparejarse con) al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases o al menos aproximadamente 30 bases, tal como entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de las siguientes secuencias *DUX4* (SEQ ID NO: 67 o 68) o de variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas:

60 *acatctcctggatgattagttcagagatat***l***ttaaaatgcccctccctgtggatcctatagaaga* (SEQ ID NO: 67; posiciones -30 a +30 de una señal de poliadenilación de *DUX4* ejemplar; la señal de poliadenilación se indica en cursiva);

*gatgattagttcagagatat***l***ttaaaatgcccctccctgtggatc* (SEQ ID NO: 68; posiciones -20 a +20 de una señal de poliadenilación de *DUX4* ejemplar; la señal de poliadenilación se indica en cursiva);

65 Preferentemente, el agente antisentido anti-*DUX4* puede ser capaz de emparejarse sobre (es decir, abarcar o atravesar) la señal de poliadenilación ATTTAAA encontrada en la SEQ ID NO: 67 o 68 o en las variantes de las

mismas.

En ejemplos no limitantes, un agente antisentido anti-*DUX4* eficaz puede configurarse para unirse a (hibridarse con) la siguiente secuencia de *DUX4* (SEQ ID NO: 69) o a variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia, o fragmentos de la misma que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de dicha secuencia o variantes. Más específicamente, dicho agente antisentido anti-*DUX4* puede comprender, constar esencialmente de o constar de una secuencia (por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico o una secuencia análoga de ácido nucleico) complementaria a dichas secuencias de *DUX4* SEQ ID NO: 69 o a variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia, o a fragmentos de la misma que comprende al menos 10 bases o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de las secuencias o variantes respectivas:

agttcagagatatataaaatgcc (SEQ ID NO: 69; posiciones -13 a +6 de una señal de poliadenilación de *DUX4* ejemplar; posiciones 12839-12863 de la secuencia de Genbank AF117653.2 (véase la Figura 3); la señal de poliadenilación se indica en cursiva);

Por ejemplo, en el presente documento se desvela un agente antisentido anti-*DUX4* que comprende, consta esencialmente de o consta de una secuencia (por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o secuencias análogas de ácido nucleico) SEQ ID NO: 65 o variantes de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente al menos aproximadamente 90 % o al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia, o fragmentos de la misma, que comprende al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de dicha secuencia o variantes:

GGGCAUUUUAAUAUAUCUCUGAACU (SEQ ID NO: 65)

en las que U representa uracilo (que opcionalmente puede reemplazarse por timina, T). En particular, los agentes antisentido anti-*DUX4* comprenden, constan esencialmente de agente de ARN de interferencia (ARNi) agente de ARN de interferencia (ARNi) o constan de una cualquiera de la secuencia SEQ ID NO: 65 o las variantes o fragmentos de la misma que presenten complementariedad con, y por tanto se configuren para unirse a (emparejarse con), las secuencias de *DUX4* anteriores SEQ ID NO: 69 o las variantes o fragmentos de las mismas.

La memoria descriptiva describe adicionalmente un agente de ARN de interferencia (ARNi) capaz de reducir o anular la producción de las proteínas *DUX4* y/o *DUX4c*.

En particular, el agente de ARNi puede configurarse para dirigirse al ARN mensajero (ARNm) de *DUX4* y/o *DUX4c*, respectivamente. Mientras que el agente de ARNi puede configurarse para dirigirse a cualquier parte del ARNm de *DUX4* y/o *DUX4c*, tal como, por ejemplo la región no traducida 5' (UTR 5'), la ORF o la UTR 3' de la misma, el agente de ARNi puede configurarse preferentemente para dirigirse a la UTR 3' del ARNm de *DUX4* y/o *DUX4c*. Los autores de la invención se percataron de que el direccionamiento de la UTR 3' del ARNm de *DUX4* y/o *DUX4c* permite la regulación negativa, mediada por ARNi de un modo particularmente eficaz, de la producción de las proteínas *DUX4* y/o *DUX4c*. Además, el direccionamiento de la UTR 3' del ARNm de *DUX4* o *DUX4c* tiene en cuenta los agentes de ARNi, que son muy específicos para el ARNm de *DUX4* o de *DUX4c*, supuestamente sin ninguna limitación debido a diferencias de secuencia en las UTR 3' distintas.

*DUX4* emerge como particularmente implicado en la etiología de FSHD. Por tanto, en el presente documento se desvela preferentemente un agente de ARNi capaz de reducir o anular la producción de la proteína *DUX4*. Dicho agente de ARNi se configura para dirigirse al ARNm de *DUX4*.

También preferentemente, en el presente documento se desvela un agente de ARNi capaz de reducir o anular la producción de la proteína *DUX4* pero no la de la proteína *DUX4c*. Dicho agente de ARNi se configura para dirigirse al ARNm de *DUX4* pero no al ARNm de *DUX4c*. En una alternativa, se desvela un agente de ARNi capaz de reducir o anular la producción de la proteína *DUX4c* pero no de la proteína *DUX4*. Dicho agente de ARNi se configura para dirigirse al ARNm de *DUX4c* pero no al ARNm de *DUX4*.

Los agentes de ARNi, como se pretende en el presente documento, pueden comprender o representar particularmente (es decir, pueden seleccionarse de un grupo que comprende o que consta de) moléculas de ácido nucleico de ARNi o moléculas de análogos de ácido nucleico de ARNi, tal como preferentemente ácidos nucleicos de interferencia cortos y análogos de ácidos nucleicos de interferencia cortos (ANic) tal como ARN de interferencia

corto y análogos de ARN de interferencia corto (ARNic), y adicionalmente pueden representar, entre otros, ARN bicatenario y análogos de ARN bicatenario (ARNbc), micro-ARN y análogos de micro-ARN (miARN) y ARN de horquilla corto y análogos de ARN de horquilla corto (ARNhc).

- 5 Ventajosamente, un agente de ARNi como se desvela en el presente documento puede conjugarse con un péptido penetrador de células (PPC) para potenciar la captación celular de dichos agentes de ARNi.

Típicamente, un agente de ARNi incluye una porción bicatenaria (a pesar de la presencia opcional y posiblemente preferida de cualquier saliente monocatenario) que comprende al menos 16 bases, preferentemente al menos 17 bases, más preferentemente al menos 18 bases e incluso más preferentemente al menos 19 bases, y normalmente entre 18 y 35 bases, preferentemente entre 19 y 30 bases, más preferentemente entre 20 y 25 bases e incluso más preferentemente entre 21 y 23 bases que son idénticas o casi idénticas a (por ejemplo, que muestran un 90 % o más, por ejemplo, al menos un 95 % de identidad de secuencia con, o que muestran un máximo de 2, y preferentemente solo de 1, emparejamiento erróneo con) un ARNm cuyo silenciamiento se desea y que por tanto es dirigido por dicho agente de ARNi (tal como por ejemplo, los ARNm de *DUX4* y/o de *DUX4c*).

Un gen *DUX4* preferentemente destinado para el direccionamiento por los agentes de ARNi como se desvela en el presente documento, reside en la unidad D4Z4 más distal que se extiende al interior de la región *pLAM* que flanquea el lado telomérico de la matriz D4Z4. Dicho gen *DUX4* conduce a la producción de uno o más ARNm comparativamente estables (Dixit et al. 2007, citado anteriormente). Como se ilustra esquemáticamente en la Figura 2 en lo que se refiere a una secuencia genómica ejemplar, aunque no limitante, como se muestra en la Figura 3, dicho gen *DUX4* comprende dos intrones que se localizan en su UTR 3', particularmente el intrón 1 (o intrón A) dentro de la unidad D4Z4 y el intrón 2 (o intrón B) proporcionado por la región *pLAM*. El corte y empalme alternativo del intrón 1 recogido esquemáticamente en la Figura 2 que conduce a ARNm de *DUX4* alternativos.

Las secuencias de ADNC de *DUX4* ejemplares, aunque no limitantes, que incluyen o no el intrón 1 se muestran en las Figuras 4 (SEQ ID NO: 42) y 5 (SEQ ID NO: 43), respectivamente.

Por consiguiente, en un ejemplo, los agentes de ARNi anti-*DUX4*, como se pretende en el presente documento, pueden configurarse para dirigirse al ARNm de *DUX4* tal como representa la secuencia de ADNc *DUX4* expuesta en la SEQ ID NO: 42 o variantes de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con la SEQ ID NO: 42. Preferentemente, dichos agentes de ARNi anti-*DUX4* pueden configurarse para dirigirse a la UTR 3' de dicho ARNm de *DUX4* o variantes, tal como por ejemplo, para dirigirse a secuencias UTR 3' correspondientes a o que se solapan con el exón 1, intrón 1, exón 2 y/o exón 3.

En otro ejemplo, los agentes de ARNi anti-*DUX4*, como se indica en el presente documento, pueden configurarse para dirigirse al ARNm de *DUX4* como representa la secuencia de ADNc de *DUX4* expuesta en la SEQ ID NO: 43 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con la SEQ ID NO: 43. Preferentemente, dichos agentes de ARNi anti-*DUX4* pueden configurarse para dirigirse a la UTR 3' de dicho ARNm de *DUX4* o variantes, tal como por ejemplo, dirigirse a secuencias UTR 3' correspondientes a o que se solapan con el exón 1, exón 2 y/o exón 3.

En un ejemplo, un agente de ARNi anti-*DUX4* puede configurarse para dirigirse a una cualquiera de las siguientes secuencias de ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 44 a 46) o variantes de las mismas, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o fragmentos de las mismas, que comprende al menos 16 bases, preferentemente al menos 17 bases, más preferentemente al menos 18 bases e incluso más preferentemente al menos 19 bases, y normalmente entre 18 y 35 bases, preferentemente entre 19 y 30 bases, más preferentemente entre 20 y 25 bases e incluso más preferentemente entre 21 y 23 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de las secuencias o variantes respectivas:

CGCGGGGAACACCUGGCUGGCUACGGAGGGGCGUG (SEQ ID NO: 44)  
 55 GCCUUCUAGGUCUAGGCCCGGUGAGAGACUCCACA (SEQ ID NO: 45)  
 UAGGCAAACCUGGAUUAGAGUUACAUCUCCUGGAU (SEQ ID NO: 46)

en las que U representa uracilo (que opcionalmente puede reemplazarse por timina, T).

En ejemplos no limitantes, un agente de ARNi anti-*DUX4* como se desvela en el presente documento puede comprender una cualquiera de las siguientes secuencias (SEQ ID NO: 47 a 49) o variantes de las mismas, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con (por ejemplo, variantes que muestran un máximo de 2 y preferentemente solo 1 un emparejamiento erróneo con) las secuencias respectivas, o fragmentos de las mismas que comprenden al menos 16 bases, preferentemente al menos 17 bases y más preferentemente al menos 18 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de las secuencias o

variantes respectivas:

acaccuggcuggcuacgga (SEQ ID NO: 47);

5 ggucuaggcccgugagag (SEQ ID NO: 48);

ccuggauuagaguacauc (SEQ ID NO: 49).

en las que U representa uracilo (que opcionalmente puede reemplazarse por timina, T).

10 Las secuencias de ADNc de *DUX4c* ejemplares pero no limitantes se muestran en las Figuras 6 (SEQ ID NO: 50) y 7 (SEQ ID NO: 51), incluyendo regiones UTR 3' de distintas longitudes.

15 Por consiguiente, en un ejemplo, los agentes de ARNi anti-*DUX4c*, como se pretende en el presente documento, pueden configurarse para dirigirse al ARNm de *DUX4c* como representa la secuencia de ADNc de *DUX4c* expuesta en la SEQ ID NO: 50 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con la SEQ ID NO: 50. Preferentemente, dichos agentes de ARNi anti-*DUX4c* pueden configurarse para dirigirse a la UTR 3' de dicho ARNm de *DUX4c* o variantes.

20 En otro ejemplo los agentes de ARNi anti-*DUX4c*, como se pretende en el presente documento, se configuran para dirigirse al ARNm de *DUX4c* como representa la secuencia de ADNc de *DUX4c* expuesta en la SEQ ID NO: 51 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con la SEQ ID NO: 51. Preferentemente, dichos agentes de ARNi anti-*DUX4c* pueden configurarse para dirigirse a la UTR 3' de dicho ARNm de *DUX4c* o variantes.

25 Como se ha indicado anteriormente, una secuencia genómica adicional, ejemplar pero no limitante, del gen *DUX4c* (n.º de registro Genbank NC\_000004 intervalo 190940254..190945505, complemento, versión de secuencia 11, es decir, NC\_000004.11 intervalo 190940254..190945505, complemento) predice un ARNm más largo de *DUX4c* que los mostrados en las Figuras 6 y 7. En particular, dicha secuencia de ADNc de *DUX4c* adicional ejemplar, pero no limitante, se encuentra disponible en la base de datos de Genbank con el n.º de registro XR\_041199 (versión de secuencia 2, es decir, XR\_041199.2) y se reproduce en la Figura 8 (SEQ ID NO: 52).

35 Por tanto, en un ejemplo, los agentes de ARNi anti-*DUX4c* pretenden, como se pretende en el presente documento, se configuran para dirigirse al ARNm de *DUX4c* como representa la secuencia de ADNc de *DUX4c* expuesta en la SEQ ID NO: 52 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con la SEQ ID NO: 52. Preferentemente, dichos agentes de ARNi anti-*DUX4c* pueden configurarse para dirigirse a la UTR 3' de dicho ARNm de *DUX4c* o variantes.

40 En un ejemplo, un agente de ARNi anti-*DUX4c* puede configurarse para dirigirse a una cualquiera de las siguientes secuencias de ARNm de *DUX4c* (SEQ ID NO: 53 a 55) o variantes de las mismas, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o fragmentos de las mismas que comprenden al menos 16 bases, preferentemente al menos 17 bases, más preferentemente al menos 18 bases, incluso más preferentemente al menos 19 bases y normalmente entre 18 y 35 bases, preferentemente entre 19 y 30 bases, más preferentemente entre 20 y 25 bases e incluso más preferentemente entre 21 y 23 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de las secuencias o variantes respectivas:

50 uguagacaccagaguuuucagcaaaaggcagaccu (SEQ ID NO: 53)

cacacagaggaggcugucuuuuuccugagcau (SEQ ID NO: 54)

55 uuucccagcguucucagucgaguuggcggagac (SEQ ID NO: 55)

en las que U representa uracilo (que opcionalmente puede reemplazarse por timina, T).

60 En ejemplos no limitantes, un agente de ARNi anti-*DUX4c* como se desvela en el presente documento puede comprender una cualquiera de las siguientes secuencias (SEQ ID NO: 56 a 58) o variantes de las mismas, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con (por ejemplo, variantes que muestran un máximo de 2 y preferentemente solo de 1 emparejamiento erróneo con) las secuencias respectivas, o fragmentos de las mismas que comprenden al menos 16 bases, preferentemente al menos 17 bases, y más preferentemente al menos 18 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de las secuencias o variantes respectivas :

ccagaguucagcaaaagg (SEQ ID NO: 56);

ggagggcugucauucuuuc (SEQ ID NO: 57);

5 gcuuucucagucgaguug (SEQ ID NO: 58);

en las que U representa uracilo (que opcionalmente puede reemplazarse por timina, T).

10 En el presente documento también se desvela un método para producir uno cualquiera de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o un agente ARNi como se explica en el presente documento, particularmente el que dicho agente comprende, consta esencialmente de, o consta de, una molécula de ácido nucleico o una molécula de un análogo de ácido nucleico, que comprende sintetizar dicho agente a partir de sus nucleótidos constituyentes o análogos de nucleótido, y opcionalmente purificar, al menos parcialmente, el agente de la reacción de síntesis.

15 Adicionalmente, en el presente documento se desvela un ácido nucleico, más específicamente un ácido nucleico aislado, que codifica uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o un agente de ARNi como se explica en el presente documento. Preferentemente, el ácido nucleico puede estar unido operativamente a una o más secuencias reguladoras que permiten la expresión del ácido nucleico en un sistema de expresión, tal como, sin limitación *in vitro* (por ejemplo, en un sistema de expresión acelular) o en una célula hospedadora o en un  
20 organismo hospedador.

También se desvela una construcción de ácido nucleico recombinante (es decir, un vector) que comprende un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*, o un agente de ARNi, como se explica en el presente documento. Dicha construcción (vector) puede permitir, entre otras cosas,  
25 propagar el ácido nucleico que codifica dicho agente, por ejemplo, *in vitro* o en una célula hospedadora u organismo hospedador. También se contempla un método para producir dicha construcción de ácido nucleico recombinante (vector) que comprende introducir el ácido nucleico que codifica dicho agente en una construcción de ácido nucleico receptora (vector receptor).

30 Preferentemente, la construcción de ácido nucleico recombinante puede ser una construcción de expresión (es decir, un vector de expresión) por tanto puede ser capaz de expresar (configurarse para expresar) el ácido nucleico que codifica el uno o más agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi en un sistema de expresión, tal como, sin limitación *in vitro* (por ejemplo, en un sistema de expresión acelular) o en una célula hospedadora u organismo hospedador. En una construcción de expresión (vector de expresión), el ácido nucleico  
35 que codifica dicho agente está unido operativamente a una o más secuencias reguladoras que permiten la expresión del ácido nucleico en dicho sistema de expresión. También se contempla por tanto un método de producción de dicha construcción de expresión (vector de expresión) que comprende introducir el ácido nucleico que codifica dicho agente en una construcción de expresión receptora (vector de expresión receptor).

40 También se desvela por tanto un método para producir cualquiera de uno o más agentes antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi como se explica en el presente documento, que comprende expresar dicho agente de una construcción de expresión (vector de expresión), como se explica en el presente documento, que comprende un ácido nucleico que codifica dicho agente, en un sistema de expresión y opcionalmente purificar, al menos  
45 parcialmente, el agente.

En el presente documento se desvela también una célula hospedadora que comprende uno cualquiera o más de agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi, o un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente, o una construcción recombinante (vector) (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica dicho agente, como se explica en el presente documento.  
50 También se incluye un método para producir dicha célula hospedadora que comprende introducir en una célula hospedadora receptora el agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente ARNi, o el ácido nucleico aislado que codifica dicho agente, o la construcción recombinante (vector) (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica dicho agente. Preferentemente, la célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota, más preferentemente una célula bacteriana, fúngica, vegetal o animal, incluso más preferentemente una célula de mamífero o una célula de primate, incluyendo muy preferentemente células humanas, así como células de mamífero, no humanas y células de primate, no humanas. Por ejemplo, dicha célula hospedadora humana puede ser un mioblasto o un precursor de mioblasto procedente de un paciente, tal como, por ejemplo, un mioblasto procedente de una biopsia de músculo de dicho paciente o procedente de un mesangioblasto de dicho paciente, o dicho mioblasto o precursor de mioblasto puede diferenciarse  
60 de una célula madre adulta o de una célula madre pluripotente inducida (iPS) de dicho paciente. El ácido nucleico aislado o construcción (vector) puede integrarse, preferentemente integrarse de manera estable, en el genoma de la célula hospedadora o puede permanecer extra-genómico o extra-cromosómico. En la medida en que la célula hospedadora comprenda dicho agente, ácido nucleico aislado o construcción (vector), esta puede representarse como una célula "transgénica" o "transformada" en este sentido. Preferentemente, una célula hospedadora expresa o está en condiciones adecuadas capaces de expresar el ácido nucleico aislado o vector comprendido en su interior,  
65 produciendo de este modo el agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi codificado por el

mismo. También se contempla por tanto un método para producir uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi, como se explica en el presente documento, que comprende cultivar o mantener una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente o una construcción de expresión (vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica dicho agente, en condiciones conductoras para la expresión de dicho agente a partir de dicho ácido nucleico aislado o construcción de expresión. El agente así producido puede pretender ejercer su efecto de silenciamiento en la célula hospedadora que lo expresa, o se puede pretender su uso en cualquier parte, en cuyo caso el método también puede comprender, purificar, de un modo opcional y preferente, al menos parcialmente, el agente.

En el presente documento también se desvela un organismo hospedador que comprende uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi, o un ácido nucleico aislado que codifica a dicho agente, o una construcción recombinante (vector) (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica a dicho agente, o una célula hospedadora, como se explica en el presente documento. También se incluye un método para producir dicho organismo hospedador, que comprende introducir el agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*, o el agente ARNi, o el ácido nucleico aislado que codifica a dicho agente, o la construcción recombinante (vector) (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica a dicho agente, en un organismo hospedador receptor, por ejemplo, en una célula, tejido u órgano de dicho organismo hospedador, o introducir la célula hospedadora, como se explica en el presente documento, en un organismo hospedador receptor, o regenerar, al menos parcialmente, un organismo a partir de dicha célula hospedadora. Preferentemente, el organismo hospedador puede ser un organismo multicelular, más preferentemente un organismo vegetal o animal, incluso más preferentemente un mamífero o primate, incluyendo particularmente mamíferos no humanos y primates no humanos. El ácido nucleico aislado o la construcción (vector) puede integrarse, preferentemente integrarse de manera estable, en el genoma del organismo hospedador o puede permanecer extra-genómico o extra-cromosómico. En la medida en que el organismo hospedador comprende dicho agente, ácido nucleico aislado o construcción (vector), esta puede representarse como un organismo "transgénico" o "transformado" en ese sentido. Preferentemente, un organismo hospedador expresa, o está en condiciones adecuadas capaz de expresar el ácido nucleico o vector aislado comprendido en su interior, mediante lo cual se produce el agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente ARNi codificado por el mismo. También se contempla por tanto un método para producir uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente ARNi como se explica en el presente documento que comprende cultivar o mantener un organismo hospedador que comprende un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente o una construcción de expresión (vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica dicho agente, en condiciones conductoras para la expresión de dicho agente a partir de dicho ácido nucleico aislado o construcción de expresión. Se pretende que el agente así producido pueda ejercer su efecto de silenciamiento en el organismo hospedador que lo expresa, o se pretende que pueda usarse en cualquier parte en cuyo caso el método puede comprender, de manera opcional y preferente, purificar al menos parcialmente el agente.

También se incluye una descendencia de la célula hospedadora o del organismo hospedador como se explica en el presente documento. Particularmente se pretende que la progenie comprenda el agente introducido, o el ácido nucleico aislado que codifica el agente, o una construcción (vector) que comprenda un ácido nucleico que codifica el agente, o que comprenda una copia duplicada de dicho ácido nucleico o construcción (vector), es decir, descendencia transgénica o transformada con respecto a dicho ácido nucleico o construcción.

También se indican composiciones y formulaciones que comprenden uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi como se explica en el presente documento, o un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente, una construcción recombinante (vector) (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión), que comprende un ácido nucleico que codifique dicho agente, o una célula hospedadora u organismo hospedador como se explica en el presente documento y uno o más componentes adicionales, tal como, sin limitación, uno o más disolventes y/o uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Adicionalmente se proporcionan métodos para producir las composiciones o formulaciones anteriores, que comprenden mezclar dicho agente, ácido nucleico aislado, construcción (vector), célula hospedadora u organismo hospedador como se explica en el presente documento con uno o más componentes adicionales.

Particularmente se indican composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*, o un agente de ARNi como se explica en el presente documento, o un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente, una construcción (vector) recombinante (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión), que comprende un ácido nucleico que codifica a dicho agente, o una célula hospedadora o un organismo hospedador como se explica en el presente documento, uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables; y métodos para producir dichas composiciones y formulaciones farmacéuticas, que comprende mezclar dicho agente, ácido nucleico aislado, construcción (vector), célula hospedadora u organismo hospedador como se explica en el presente documento con dichos uno o más vehículos farmacéuticamente aceptable.

Adicionalmente en el presente documento se desvelan kits de componentes que comprenden uno o más agentes antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi como se explica en el presente documento, o un ácido nucleico aislado que codifica a dicho agente, una construcción (vector) recombinante (preferentemente una

construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica a dicho agente, o una célula hospedadora u organismo hospedador o su descendencia como se explica en el presente documento, o una o más composiciones o formulaciones que comprenden una cualquiera de estas. Los componentes de los kits pueden estar en diversas formas, tales como, por ejemplo, formas liofilizadas, libres en solución o inmovilizadas en una fase sólida. Estos pueden proporcionarse, por ejemplo, en una placa multipocillo o como una matriz o micromatriz, o pueden envasarse por separado y/o individualmente. Adicionalmente, un kit comprenderá típicamente instrucciones para su uso. Ventajosamente los kits pueden emplearse en diversas aplicaciones, tales como, entre otras, aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, de exploración de compuestos y para su uso en investigación.

Se proporciona además:

- uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*, o un agente de ARNi como se explica en el presente documento, o un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente, una construcción (vector) recombinante (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica dicho agente, o una célula hospedadora u organismo hospedador o su descendencia como se explica en el presente documento, o una o más composiciones o formulaciones que comprenden una cualquiera de estas, para su uso como un medicamento; o para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección cuyo tratamiento puede beneficiarse de la reducción de la expresión de la doble homeocaja 4 y/o de la doble homeocaja 4c;
- el uso de uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*, o un agente de ARNi como se explica en el presente documento, o un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente, una construcción (vector) recombinante (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica a dicho agente, o una célula hospedadora u organismo hospedador o su descendencia como se explica en el presente documento, o una o más composiciones o formulaciones que comprenden cualquiera de estas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección cuyo tratamiento puede beneficiarse de la reducción de la expresión de la doble homeocaja 4 y/o doble homeocaja 4c; o
- un método para el tratamiento de una enfermedad o afección cuyo tratamiento puede beneficiarse de la reducción de la expresión de la doble homeocaja 4 y/o doble homeocaja 4c en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*, o un agente de ARNi como se explica en el presente documento, o un ácido nucleico aislado que codifica dicho agente, una construcción (vector) recombinante (preferentemente una construcción de expresión, vector de expresión) que comprende un ácido nucleico que codifica a dicho agente o una célula hospedadora u organismo hospedador o su descendencia o como se explica en el presente documento, o una o más composiciones o formulaciones que comprenden cualquiera de estas.

Preferentemente, las enfermedades o afecciones incluyen las que comprenden niveles aumentados y/o actividad aumentada de la doble homeocaja 4 y/o doble homeocaja 4c, más preferentemente la enfermedad o afección es la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD). La doble homeocaja 4 emerge como particularmente implicada en la etiología de la FSHD. Por tanto se prefieren agentes antisentido anti-*DUX4* y/o de ARNi y los reactivos relacionados o derivados.

Deberá apreciarse que, en el presente documento, la referencia a “uno cualquiera o más de un agente antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* o agente de ARNi” no solo incluye dichos agentes individuales, sino también cualquier combinación de dos o más de dichos agentes. Se indica expresamente sin limitación, una combinación de dos o más agentes antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*; una combinación de dos o más agentes de ARNi anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*; una combinación de uno o más agentes antisentido anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* y uno o más de un agente de ARNi anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c*. Los agentes en una combinación de dos o más agentes pueden proporcionarse típicamente como moléculas distintas, o pueden de otra manera conjugarse de manera covalente o no covalente entre sí, bien directamente o mediante un enlazador o un vehículo adecuado. Un ejemplo no limitante de agentes de unión incluye agentes “weasel” (comadreja) de dos o más oligonucleótidos antisentido unidos conjuntamente como se desvela en el documento WO 2006/000057 o en Aartsma-Rus *et al.* 2004 (Am J Hum Genet 74: 83-92).

#### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra una representación esquemática de los transcritos de *DUX4* expresados a partir de una matriz de repetición D4Z4 patógena ejemplar que contiene cuatro unidades D4Z4 (flechas grises) en el locus 4q35. Cada una de las cuatro unidades D4Z4 contiene la fase de lectura abierta (ORF, *open reading frame*) de *DUX4* (recuadros blancos) y un sitio de inicio de la transcripción (flechas blancas dobladas). La matriz de repetición está flanqueada en su extremo telomérico por la región *pLAM* (recuadro gris) que solo está presente en el alelo 4qA ligado exclusivamente a la FSHD. El alelo 4qB alternativo no está ligado a la FSHD (Lemmers *et al.* 2004 (Am J Hum Genet 75(6): 1124-30)).

La Figura 2 ilustra un esquema de un fragmento genómico de *EcoRI* clonado en pGEM7Z y que incluye la porción 3' de la ORF de *DUX4* y su UTR 3'. El codón de terminación de la ORF de *DUX4*, la región *pLAM* y la señal de adición poli-A (ATTTAA) se indican en el panel superior. El panel inferior recoge la representación en el mapa de los extremos de ARNm en 3' e ilustra la localización de los intrones 1 y 2. El intrón 1 está alternativamente cortado y empalmado. Las posiciones nucleotídicas son como se muestra en la secuencia de la Figura 3.

La Figura 3 ilustra la secuencia (SEQ ID NO: 1) de un fragmento genómico ejemplar como se expone esquemáticamente en la Figura 2, que incluye la porción 3' de la ORF de *DUX4* y su UTR 3'. Esta secuencia particular reproduce las posiciones 12001 a 13080 de la secuencia genómica disponible en la base de datos de Genbank del NCBI con el número de registro AF117653 (versión de secuencia n.º 2, es decir, AF117653.2). En esta secuencia AF117653 dicha ORF de *DUX4* se extiende desde un codón de inicio de la traducción ATG en la posición 10829 (no mostrada) hasta el codón de terminación en las posiciones 12101-12103 (en recuadro). El exón 1 finaliza en la posición 12111, el intrón 1 se extiende desde la posición 12112 a la 12247 en la unidad D4Z4 (en cursiva), el exón 2 se extiende desde la posición 12248 a la 12329 (en negrita), la última unidad D4Z4 finaliza en la posición 12329 continuando con la región *pLAM*, el intrón 2 se extiende desde la posición 12330 a la 12684 (más largo) (en cursiva) o como alternativa 2338-12682 (más corto) y el exón 3 se extiende desde la posición 12685 a la 12873 (en negrita).

La Figura 4 ilustra la secuencia (SEQ ID NO: 42) de un ADNc de *DUX4* ejemplar. La ORF de *DUX4*, delimitada por el codón de inicio de la traducción (en negrita, en recuadro) y el codón de terminación (en recuadro), y la UTR 5' aguas arriba del codón ATG, corresponde a estas porciones en la secuencia de ADNc de *DUX4* ejemplar disponible en Genbank con el n.º de registro NM\_033178 (versión de secuencia 2, es decir, NM\_033178.2). La UTR 3' aguas abajo del codón de terminación (es decir, comenzando desde la posición 1576 de la SEQ ID NO: 42) se recopila desde la secuencia genómica *DUX4* AF117653.2 (véase la Figura 3 y la leyenda de la misma) e incluye el exón 1, el intrón 1 (en cursiva), el exón 2 (en negrita) y el exón 3 (subrayado) restantes.

La Figura 5 ilustra la secuencia (SEQ ID NO: 43) de un ADNc de *DUX4* ejemplar. La ORF de *DUX4*, delimitada por el codón de inicio de la traducción (en negrita, en recuadro) y el codón de terminación (en recuadro), y la UTR 5' aguas arriba del codón ATG corresponde a estas porciones en la secuencia de ADNc de *DUX4* ejemplar disponible en Genbank con el n.º de registro NM\_033178 (versión de secuencia 2, es decir, NM\_033178.2). La UTR 3' aguas abajo del codón de terminación (es decir, comenzando desde la posición 1576 de la SEQ ID NO: 43) se recopila desde la secuencia genómica *DUX4* AF117653.2 (véase la Figura 3 y la leyenda de la misma) e incluye el exón 1, el exón 2 (en negrita) y el exón 3 (subrayado) restantes.

La Figura 6 ilustra la secuencia (SEQ ID NO: 50) de un supuesto ADNc de *DUX4c* ejemplar. Esta secuencia corresponde a las posiciones de la 727 a la 2440 de una secuencia genómica ejemplar pero no limitante del gen *DUX4c*, (n.º de registro de Genbank AY500824, versión de secuencia 1, es decir, AY500824.1). Se indican la supuesta caja GC (subrayada) en las posiciones 1-13 de la SEQ ID NO: 50 (posiciones 727-739 de AY500824.1), la supuesta variante de caja TATA (con doble subrayado) en las posiciones 48-52 de la SEQ ID NO: 50 (posiciones 774-778 de AY500824.1), la ORF de *DUX4c* delimitada por el codón de inicio de la traducción (en negrita, en recuadro) en las posiciones 192-194 de la SEQ ID NO: 50 (posiciones 918-920 de AY500824.1) y el codón de terminación (en recuadro) en las posiciones 1314-1316 de la SEQ ID NO: 50 (posiciones 2040-2042 de AY500824.1). La UTR 3' como se detecta experimentalmente se extiende aguas abajo del codón de terminación (es decir, comenzando desde la posición 1317 de la SEQ ID NO: 50; posición 2043 de AY500824.1) hacia abajo a la posición 1714 de la SEQ ID NO: 50 (posición 2440 de AY500824.1).

La Figura 7 ilustra la secuencia (SEQ ID NO: 51) de un supuesto ADNc de *DUX4c* ejemplar. Esta secuencia corresponde a las posiciones de la 727 a la 2629 de una secuencia genómica ejemplar pero no limitante del gen *DUX4c*, (n.º de registro de Genbank AY500824, versión de secuencia 1, es decir, AY500824.1). Se indican la supuesta caja GC (subrayada) en las posiciones 1-13 de la SEQ ID NO: 51 (posiciones 727-739 de AY500824.1), la supuesta variante de caja TATA (con doble subrayado) en las posiciones 48-52 de la SEQ ID NO: 51 (posiciones 774-778 de AY500824.1), la ORF de *DUX4c* delimitada por el codón de inicio de la traducción (en negrita, en recuadro) en las posiciones 192-194 de la SEQ ID NO: 51 (posiciones 918-920 de AY500824.1) y el codón de terminación (en recuadro) en las posiciones 1314-1316 de SEQ ID NO: 51 (posiciones 2040-2042 de AY500824.1). La UTR 3' como se detecta experimentalmente en un paciente con FSHD se extiende aguas abajo del codón de terminación (es decir, comenzando desde la posición 1317 de la SEQ ID NO: 51; posición 2043 de AY500824.1) hacia abajo a la posición 1903 de la SEQ ID NO: 51 (posición 2629 de AY500824.1).

La Figura 8 ilustra la secuencia (SEQ ID NO: 52) de un supuesto ADNc de *DUX4c* ejemplar. Esta secuencia corresponde al ARNm de *DUX4c* previsto como disponible en la base de datos de Genbank con el n.º de acceso XR\_041199 (versión de secuencias 2, es decir, XR\_041199.2). Se indican la ORF de *DUX4c* delimitada por el codón de inicio de la traducción (en negrita, en recuadro) en las posiciones 688-670 y el codón de terminación (en recuadro) en las posiciones 1810-1812. La UTR 3' predicha se extiende aguas abajo del codón de terminación (es decir, comenzando desde la posición 1813).

La Figura 9 ilustra el efecto inhibitorio de oligómeros antisentido del pre-ARNm anti-*DUX4* sobre la expresión de la proteína *DUX4*.

5 Las Figuras 10 y 11 ilustran que el oligómero antisentido 1524 puede ejercer un efecto inhibitorio específico sobre la expresión de la proteína *DUX4*.

La Figura 12 ilustra que los oligómeros antisentido 1524, 1523 y 1522 pueden ejercer un efecto inhibitorio específico sobre la expresión de la proteína *DUX4*.

10 Las Figuras 13 y 14 ilustra la evaluación del direccionamiento del ARNip a *DUX4c*.

La Figura 15 ilustra la evaluación del direccionamiento del ARNip a *DUX4*.

15 La Figura 16 ilustra la evaluación de la especificidad del ARNip anti-*DUX4c* y anti-*DUX4* por transferencia de Western. (A) anticuerpo anti-*DUX4*, (B) anticuerpo anti-*DUX4c*.

La Figura 17 ilustra el vector de expresión pLVTH-ARNhc.

20 La Figura 18 ilustra esquemáticamente la producción de ARNhc de un vector de ARNhc y su posterior procesamiento a ARNic por Dicer.

La Figura 19 ilustra la eficiencia y especificidad de vectores de ARNhc por transferencia de Western.

25 La Figura 20 ilustra una secuencia ejemplar de la proteína *DUX4*.

La Figura 21 ilustra una secuencia ejemplar de la proteína *DUX4c*.

La Figura 22 ilustra condiciones de transfección óptimas para mioblastos primarios con FSHD.

30 La Figura 23 ilustra la evaluación del direccionamiento del ARNip a *DUX4* en mioblastos primarios con FSHD.

La Figura 24 ilustra una representación esquemática de la estructura de un oligonucleótido químicamente modificado con un esqueleto de 2'-O-metil fosforotioato.

35 La Figura 25 ilustra una representación esquemática de la estructura de un oligonucleótido químicamente modificado con un esqueleto de morfolino fosforodiamidato.

40 La Figura 26 ilustra transcritos ejemplares procedentes de una o más unidades D4Z4 y que comprenden o no la región *pLAM*. El panel superior muestra esquemáticamente fragmentos genómicos de una unidad D4Z4 y la región *pLAM*. La ORF de *DUX4* se representa en negrita con las dos regiones homeocaja en gris. Se indican las posiciones de los diferentes intrones (recuadros de color gris oscuro). La región *pLAM* incluye un intrón (recuadro de color gris oscuro) y la señal poli-a (ATTAAA). Los paneles inferiores ilustran la localización de los intrones 1, 2, 2a, 1 bis y 2a bis. El primer transcrito publicado (Dixit *et al.*, citado anteriormente) empieza en la última unidad D4Z4 con un corte y empalme alternativo del intrón 1 en la secuencia D4Z4, extendiéndose después en la región *pLAM* en la que el intrón 2 está siempre cortado y empalmado y acaba en 6 a 16 pares de bases después de la señal poli-A. Se descubrió un segundo transcrito (Coppée *et al.*, no publicado) que comienza en una unidad D4Z4 (adyacente o no a la última unidad) que tiene el mismo intrón 1 que el indicado anteriormente. El transcrito continúa en la unidad D4Z4 adyacente donde se descubrió otro intrón que se denominó 2a si el sitio aceptor de corte y empalme estaba en la unidad D4Z4 o 2a bis si el sitio aceptor de corte y empalme estaba en la región *pLAM*. No se indicaron señales poli-A en las proximidades. Snider *et al.*, citado anteriormente, descubrieron un transcrito de *DUX4* correspondiente al descrito en Dixit *et al.* y un transcrito de *DUX4* con 2 copias del exón 2.

55 La Figura 27 ilustra la secuencia genómica ejemplar de los transcritos de *DUX4* de la Figura 26. Snider *et al.* indicaron una secuencia diferente para el inicio de la región *pLAM* que contenía el sitio de corte y empalme donante del intrón 2 (secuencia en recuadro GGTACC). La comparación de secuencias reveló que esta secuencia era idéntica a aquellas en el inicio de una unidad D4Z4 rodeando el sitio donante de corte y empalme del intrón 2a (Coppée *et al.*).

60 La Figura 28 muestra esquemáticamente la estructura del gen *DUX4* alineando variantes D4Z4 y *pLAM*. Se representan dos unidades D4Z4 adyacentes a escala del número de registro del Genbank AF117653.1 (primera y segunda línea) así como la región *pLAM* flanqueante (cuarta línea). Esta región difiere de la representada en la tercera línea (número de registro de GenBank U74497.1) por una delección de un segmento de 1609 pb (franja vertical). Esta región *pLAM* (tercera línea) es casi idéntica a una unidad D4Z4 en 1890 pb (franja gris) y diverge en secuencias distales adicionales. La delección de 1609 pb en la región *pLAM* de la cuarta línea se descubrió en la región casi idéntica a D4Z4. La ORF de *DUX4* se representa en color negro con las dos regiones homeocaja en gris. Se indican las posiciones de los diferentes intrones (recuadro de color gris oscuro). Los sitios

de inicio del ARNm de *DUX4* se indican mediante flechas negras hacia arriba para el 1º ARNm (Dixit *et al.* 2007) y el 2º ARNm (Coppée *et al.*, no publicado). Los extremos del ARNm de *DUX4* se indican con flechas hacia abajo en negras. Se descubrieron diferentes extremos: de 6 a 16 pb aguas abajo de la señal poli-A (Dixit *et al.*, 2007) para el 1º ARNm y dos posibles extremos (en D4Z4 o en *pLAM*) para el 2º ARN.

5 La Figura 29 ilustra la eficacia de los oligonucleótidos antisentido 1521 (a) y 1523 (b) en la disminución de la cantidad de ARNm de *DUX4* endógeno en miotubos primarios con FSHD.

10 La Figura 30 ilustra la eficacia del ARNip3 anti-*DUX4* en la disminución de la cantidad de ARNm de *DUX4* endógeno en miotubos primarios con FSHD.

15 La Figura 31 muestra esquemáticamente la posición de los oligonucleótidos antisentido 2245 y 2250 sobre el fragmento de la secuencia genómica de *DUX4* disponible en Genbank con el n.º de registro AF117653 (versión de secuencia 2, es decir, AF117653.2). (Véase la Figura 3 y la leyenda en la misma). Este fragmento de secuencia incluye el intrón 1 (en cursiva), exón 2 (en negrita), exón 3 (en cursiva y negrita) y el codón de terminación de la ORF de *DUX4* (en recuadro), los oligonucleótidos antisentido 2245 (subrayados) y 2250 (subrayado, en negrita).

20 La Figura 32 ilustra el efecto inhibitor de los oligómeros antisentido 2245 y 2250 sobre la expresión de la proteína *DUX4*.

La Figura 33 ilustra la concentración óptima del oligómero antisentido 2245 para la inhibición específica de la expresión de la proteína *DUX4*.

25 Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, a menos que el contexto indique claramente otra cosa, las formas en singular “uno”, “una”, “un”, “el” y “la”, incluyen referentes tanto en singular como en plural.

30 Las expresiones “que comprende”, “comprende” y “comprendido por” como se usan en el presente documento son expresiones sinónimas junto con “que incluye”, “incluye” o “que contiene”, “contiene” y son inclusivas y abiertas y no excluyen miembros, elementos o etapas de métodos adicionales, no enumerados.

35 La relación de intervalos numéricos mediante puntos extremos incluye todos los números y fracciones incluidos dentro de los intervalos respectivos, así como los puntos extremos enumerados.

40 Las expresiones “aproximadamente” o “alrededor de” como se usan en el presente documento cuando se hace referencia un valor medible, tal como un parámetro, una cantidad, una duración de tiempo y similares, significan que se incluyen variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones de +/-10 % o menores, preferentemente de +/-5 % o menores, más preferentemente de +/-1 % o menores, e incluso más preferentemente de +/-0,1 % o menores de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones sean apropiadas para interpretarse en la memoria descriptiva desvelada. Debe entenderse que el valor, cuyo modificador “aproximadamente” se refiere a sí mismo, también se desvela específica y preferentemente.

45 Todos los documentos citados en la presente memoria descriptiva se incorporan en la misma por referencia en su totalidad.

50 A menos que se defina de otra manera, todos los términos que se usan en la descripción de la memoria descriptiva, incluyendo términos técnicos y científicos, tienen el significado que normalmente entiende un experto habitual en la materia a la cual pertenece esta memoria descriptiva. Mediante otras ayudas, pueden incluirse definiciones de términos para apreciar mejor las explicaciones de la presente memoria descriptiva.

55 Para métodos generales relacionados con la memoria descriptiva, se hace referencia, entre otros, a libros de texto muy conocidos, incluyendo, por ejemplo, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed.” (Sambrook *et al.*, 1989), Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987), the series Methods in Enzymology (Academic Press), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); “Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Ed.” (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987 & 1995); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu ed., Academic Press 1995).

60 Las técnicas generales en cuanto a usos de medios y cultivos celulares, se indican, entre otros, en Cultivos Celulares de Mamífero a Gran Escala (Hu *et al.* 1997. Curr Opin Biotechnol 8: 148); Medios Asépticos (K. Kitano. 1991. Biotechnology 17: 73); o Cultivos Celulares de Mamífero a Gran Escala (Curr Opin Biotechnol 2: 375, 1991).

65 Como se usa en el presente documento, las expresiones “doble homeocaja 4” y “*DUX4*” son sinónimas y se refieren a genes, a productos génicos, a ácidos nucleicos, a proteínas y a polipéptidos, habitualmente conocidos con estos nombres en la técnica. Las expresiones incluyen dichos genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y

polipéptidos encontrados en cualquier organismo, y particularmente de animales, preferentemente vertebrados, más preferentemente mamíferos, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos, incluso más preferentemente de seres humanos.

5 Las expresiones incluyen particularmente dichos genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos con una secuencia nativa, es decir, una cuya secuencia primaria sea igual que la encontrada en DUX4 o procedente de la naturaleza. Un experto en la materia entiende que las secuencias nativas de DUX4 pueden diferir entre especies diferentes debido a la divergencia genética entre dichas especies. Además, las secuencias nativas de DUX4 pueden diferir entre o dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a la diversidad genética normal (variación genética) o debido a mutaciones dentro de una especie determinada. Además, las secuencias nativas de DUX4 pueden diferir entre o incluso dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a modificaciones postranscripcionales o postraduccionales. Por consiguiente, se considera que todas las secuencias de DUX4 encontradas en o procedentes de la naturaleza son "nativas".

15 Las expresiones incluyen genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos de DUX4 cuando forman parte de un organismo, un órgano, un tejido o una célula vivos, cuando forman parte de una muestra biológica, así como cuando están, al menos parcialmente, aislados de dichas fuentes. Las expresiones también incluyen genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos cuando se producen por medios recombinantes o sintéticos.

20 El gen *DUX4*, como se indica en el presente documento, puede representar particularmente un gen *DUX4* presente en la unidad más distal de una matriz de D4Z4 en el cromosoma 4q35, particularmente en el que el gen *DUX4* se extiende en la región *pLAM* que flanquea el lado telomérico de la matriz de D4Z4, más particularmente en el que dicha región *pLAM* proporciona una señal de poliadenilación, tal como preferentemente ATTA. Dicho gen *DUX4* conduce a la producción de ARNm (s) comparativamente estable (Dixit *et al.* 2007, citado anteriormente).

25 Aunque se han identificado transcritos de *DUX4* adicionales que pueden abarcar diversas unidades D4Z4 y que pueden presentar un corte y empalme alternativo, y preferentemente también comprender la región *pLAM* (Snider *et al.* 2009, citado anteriormente; Coppée *et al.* no publicado), el gen *DUX4* como se indica en el presente documento también puede representar particularmente dichas unidades de transcripción que residen en D4Z4, particularmente las que dan lugar a un transcrito que conduce a la producción de ARNm comparativamente estable que comprende secuencias de *DUX4*, incluso más particularmente en el que el transcrito comprende la región *pLAM*, aún más particularmente en el que dicha región *pLAM* proporciona una señal de poliadenilación, tal como preferentemente ATTA. Dichos transcritos y ARNm de *DUX4* se ilustran esquemáticamente en las Figuras 26 y 28 con referencia a una secuencia genómica ejemplar pero no limitante como se muestra en la Figura 27.

35 También deberá apreciarse que la región *pLAM* puede presentar polimorfismos, tal como, sin limitación, la presencia o ausencia de una secuencia de 1,6 kb en su intrón (Gabriëls *et al.* 1999, citado anteriormente; van Deutekom *et al.* 2009, citado anteriormente).

40 Incluso más particularmente, el gen *DUX4* como se indica en el presente documento, representa el gen *DUX4* como se ha indicado anteriormente, como presente en una matriz de D4Z4 patogénica asociada con distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD).

45 El gen *DUX4* ejemplar incluye, sin limitación, el gen *DUX4* humano que tiene la secuencia de ácido nucleico como se refleja en el Genbank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el número de registro AF117653 (versión de secuencia n.º 2, revisado el 30 de noviembre de 2009, es decir, AF117653.2), más particularmente el gen *DUX4* en las posiciones de aproximadamente 10650 a aproximadamente 12873 de AF117653.2, también particularmente en las posiciones de aproximadamente 10829 a aproximadamente 12873 de AF117653.2.

50 El ADNc (y su ARNm respectivo) de *DUX4c* ejemplar, pero no limitante, incluye sin limitación ADNc de *DUX4* humano que tiene la secuencia de ácido nucleico como se refleja en el Genbank con el número de registro NM\_033178 (versión de secuencia 2, revisado el 28 de febrero de 2010, es decir, NM\_033178.2). Adicionalmente, el ADNc (y su ARNm respectivo) de *DUX4c* ejemplar, pero no limitante, incluye sin limitación ADNc de *DUX4* humano que tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 42 (Figura 4) o en la SEQ ID NO: 43 (Figura 5).

60 La proteína o el polipéptido de *DUX4* ejemplar que incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido de *DUX4* humano, que tiene la secuencia de aminoácidos primaria como se refleja en el Genbank con el número de registro NP\_149418 (versión de secuencia 3, revisado el 28 de febrero de 2010, es decir, NP\_149418.3), también se reproduce en la Figura 20 como SEQ ID NO: 59.

65 Como se usa en el presente documento, las expresiones "doble homeocaja 4c" y "DUX4c" son sinónimas y se refieren a genes, a productos génicos, a ácidos nucleicos, proteínas y a polipéptidos comúnmente conocidos con estos nombres en la técnica. Las expresiones incluyen dichos genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos encontrados en cualquier organismo, y particularmente de animales, preferentemente vertebrados,

más preferentemente mamíferos, incluyendo seres humanos y mamíferos no humanos, incluso más preferentemente de seres humanos.

Las expresiones incluyen particularmente dichos genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos con una secuencia nativa, es decir, una cuya secuencia primaria sea igual que la encontrada en DUX4c o procedente de la naturaleza. Un experto en la materia entiende que las secuencias nativas de DUX4c pueden diferir entre especies diferentes debido a la divergencia genética entre dichas especies. Además, las secuencias nativas de DUX4c pueden diferir entre o dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a la diversidad genética normal (variación genética) o debido a mutaciones dentro de una especie determinada. Además, las secuencias nativas de DUX4c pueden diferir entre o incluso dentro de individuos diferentes de la misma especie debido a modificaciones postranscripcionales o postraduccionales. Por consiguiente, se considera que todas las secuencias de DUX4c encontradas en o procedentes de la naturaleza son "nativas".

Las expresiones incluyen genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos de DUX4c cuando forman parte de un organismo, un órgano, un tejido o una célula vivos, cuando forman parte de una muestra biológica, así como cuando están, al menos parcialmente, aislados de dichas fuentes. Las expresiones también incluyen genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos cuando se producen por medios recombinantes o sintéticos.

El gen *DUX4c* ejemplar incluye sin limitación el gen *DUX4c* humano que tiene la secuencia de ácido nucleico como se refleja en el Genbank con el número de registro AY500824 (versión de secuencia 1, revisado el 1 de diciembre de 2009, es decir, AY500824.1). Otro gen *DUX4c* ejemplar incluye, sin limitación, el gen *DUX4c* humano que tiene la secuencia de ácido nucleico como se refleja en el Genbank con el número de registro NC\_000004 intervalo 190940254... 190945505, complemento (versión de secuencia 11, revisado el 10 de junio de 2009, es decir, NC\_000004.11).

El ADNc (y su ARNm respectivo) de *DUX4c* ejemplar, pero no limitante, incluye sin limitación ADNc de *DUX4c* humano que tiene la secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO: 50 (Figura 6) o en la SEQ ID NO: 51 (Figura 7). Otro ADNc (y su ARNm respectivo) de *DUX4c* ejemplar pero no limitante, que incluye sin limitación, ADNc de *DUX4c* humano que tiene la secuencia de ácido nucleico como se refleja en el Genbank con el n.º de registro XR\_041199 (versión de secuencia 2, revisado el 10 de junio de 2009, es decir, XR\_041199.2) también se reproduce en la Figura 8.

La proteína o el polipéptido de *DUX4c* ejemplar que incluye, sin limitación, la proteína o el polipéptido de *DUX4c* humano que tiene la secuencia de aminoácidos primaria como se refleja en el Genbank con el n.º de registro AAS15569 (versión de secuencia 1, revisado el 1 de diciembre de 2009, es decir, AAS15569.1), también se reproduce en la Figura 21 como SEQ ID NO: 60.

Deberá apreciarse que otros genes *DUX* homólogos a *DUX4* y/o a *DUX4c* están presentes en el genoma humano y se transcriben a partir del mismo, pero no están relacionados con la FSHD. Por consiguiente, los agentes antisentido y de ARNic, como se indica en el presente documento, se dirigen preferentemente a los genes *DUX4* y/o *DUX4c* específicamente, es decir, sustancialmente con respecto a la exclusión de otros genes *DUX*. En particular, dichos agentes específicos pueden presentar identidad de secuencia adecuada con secuencias de *DUX4* y/o *DUX4c* pero no con dichos otros genes *DUX*. En este sentido, los agentes antisentido y de ARNic particulares, como se explica en el presente documento, son muy ventajosos.

La referencia en el presente documento a genes, productos génicos, ácidos nucleicos, proteínas y polipéptidos de *DUX4* y *DUX4c*, también incluyen fragmentos y/o variantes de las sustancias respectivas.

El término "fragmento", en lo que se refiere a una proteína o a un polipéptido, generalmente representa una forma truncada N y/o C terminal de una proteína o un polipéptido. Preferentemente, un fragmento puede comprender al menos aproximadamente el 30 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 % o al menos aproximadamente el 70 %, preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, e incluso más preferentemente al menos el 95 % o incluso aproximadamente el 99 % de la longitud de secuencia de aminoácidos de dicha proteína o polipéptido.

El término "fragmento", en lo que se refiere a un ácido nucleico (polinucleótido) generalmente representa una forma truncada en 5' y/o 3' de un ácido nucleico. Preferentemente, un fragmento puede comprender al menos aproximadamente el 30 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 50 % o al menos aproximadamente el 70 %, preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, por ejemplo, al menos aproximadamente el 85 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %, e incluso más preferentemente al menos el 95 % o incluso aproximadamente el 99 % de la longitud de secuencia de ácido nucleico de dicho ácido nucleico.

El término "variante" de un ácido nucleico (polinucleótido), proteína o polipéptido, indicado, determinado(a), se refiere a ácidos nucleicos, proteínas o polipéptidos cuya secuencia (es decir, secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos, respectivamente) es sustancialmente idéntica (es decir, en gran medida, pero no completamente

idéntica) a la secuencia de dicho ácido nucleico, proteína o polipéptido indicado, por ejemplo, al menos aproximadamente 80 % idéntica o al menos aproximadamente 85 % idéntica, por ejemplo, preferentemente al menos aproximadamente 90 % idéntica, por ejemplo, al menos 91 % idéntica, 92 % idéntica, más preferentemente al menos aproximadamente 93 % idéntica, por ejemplo, al menos 94 % idéntica, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 95 % idéntica, por ejemplo, al menos 96 % idéntica, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 97 % idéntica, por ejemplo, al menos 98 % idéntica, y más preferentemente al menos 99 % idéntica. Preferentemente, una variante puede presentar dichos grados de identidad con un ácido nucleico, proteína o polipéptido indicado, cuando toda la secuencia del ácido nucleico, proteína o polipéptido indicado está consultándose en el alineamiento de secuencia (es decir, identidad de secuencia global).

También se incluyen entre los fragmentos y variantes de un ácido nucleico, proteína o polipéptido indicado determinado(a), productos de fusión de dicho ácido nucleico, proteína o polipéptido con otro ácido nucleico, proteína o polipéptido no relacionado(a), respectivamente. Por tanto, particularmente, entre los fragmentos y las variantes que se incluyen, como se indica en el presente documento, se encuentran genes de fusión entre el gen *DUX4* o *DUX4c* y otros genes, lo que conduce a la expresión de proteínas de fusión (es decir, quiméricas). Más específicamente se incluyen dichos genes de fusión que surgen a través de reordenaciones cromosómicas, incluso más específicamente en el que dichos genes de fusión y sus proteínas quiméricas causan o contribuyen a ser la causa de una patología. Por tanto, como ejemplos de fragmentos y variantes de *DUX4* o *DUX4c* que se incluyen en el presente documento y que pueden beneficiarse del direccionamiento mediante los agentes antisentido o de ARNi de la presente memoria descriptiva, se incluyen fusiones entre C/C, un homólogo humano de *Drosophila capicúa*, y *DUX4*, como se observa en la familia de tumores de Ewing (FTE) Kawamura-Saito *et al.* 2006, citado anteriormente) y sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados (STBI) (Yoshimoto *et al.* 2009, citado anteriormente), y fusiones entre *EWSR1* y *DUX4*, como se observa en rhabdomyosarcomas (RMS) (Sirvent *et al.* 2009, citado anteriormente). Más generalmente, se indican fusiones que contienen el fragmento C terminal de *DUX4*, dado que las proteínas quiméricas resultantes adquieren una actividad transcripcional potenciada, lo que puede conducir a la formación de tumores.

La identidad de secuencia puede determinarse usando algoritmos adecuados para realizar alineamientos de secuencias y la determinación de la identidad de secuencia es de por sí conocida. Como algoritmos ejemplares, pero no limitantes, se incluyen los que están basados en la Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básica (BLAST) originalmente descrita por Altschul *et al.* 1990 (J Mol Biol 215: 403-10), tal como el algoritmo de "secuencias Blast 2" descrito por Tatusova y Madden 1999 (FEMS Microbiol Lett 174: 247-250), por ejemplo, usando los ajustes por defecto publicados y otros ajustes adecuados (tales como, por ejemplo, para el algoritmo BLASTN: coste por apertura de hueco = 5, coste por extensión de hueco = 2, penalización por un emparejamiento erróneo = -2, recompensa por un emparejamiento = 1, caída de alineación de hueco  $x = 50$ , valor esperado = 10,0, tamaño de palabra = 28; o para el algoritmo BLASTP: matriz = Blosom62, coste por apertura de hueco = 11, coste por extensión de hueco = 1, valor esperado = 10,0, tamaño de palabra = 3).

En una realización, una variante de un ácido nucleico (polinucleótido), proteína o polipéptido determinado(a) puede ser un homólogo (por ejemplo, ortólogo o parólogo) de dicho ácido nucleico, proteína o polipéptido. Como se usa en el presente documento, el término "homología" generalmente indica similitud estructural entre dos macromoléculas, particularmente entre dos ácidos nucleicos, proteínas o polipéptidos, del mismo taxón o de taxones diferentes, debiéndose dicha similitud a un ancestro compartido.

Cuando la presente memoria descriptiva se refiere a variantes y/o a fragmentos de sustancias, tales como agentes antisentido o de ARNi, ácidos nucleicos, proteínas o polipéptidos, esto indica particularmente variantes y/o fragmentos que son "funcionales", es decir, que conservan, al menos parcialmente, la actividad biológica o la funcionalidad esperada de los agentes, ácidos nucleicos, proteínas o polipéptidos respectivos.

Mediante un ejemplo y sin limitación, una variante funcional y/o fragmento de un gen, producto génico, ácido nucleico, proteína o polipéptido de *DUX4* o *DUX4c*, conservarán al menos parcialmente la actividad biológica de *DUX4* o *DUX4c*, respectivamente. Por ejemplo, dicha variante funcional y/o fragmento puede conservar uno o más aspectos de la actividad biológica de *DUX4* o *DUX4c*, tal como, por ejemplo, capacidad de participar en una o más rutas celulares, capacidad de regular la transcripción de uno o más genes, etc.

Mediante un ejemplo y sin limitación, una variante funcional y/o fragmento de un agente antisentido o agente de ARNi anti-*DUX4* y/o anti-*DUX4c* agente conservará al menos parcialmente la funcionalidad de dicha agente, es decir, su estabilidad para reducir o anular la expresión de la molécula diana tal como *DUX4* y/o *DUX4c*.

Preferentemente, una variante funcional y/o fragmento puede conservar al menos aproximadamente un 20 %, por ejemplo, al menos un 30 %, o al menos aproximadamente un 40 %, o al menos aproximadamente un 50 %, por ejemplo, al menos un 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 70 %, por ejemplo, al menos un 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 85 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, y más preferentemente al menos aproximadamente un 95 % e incluso aproximadamente el 100 % o más de la actividad biológica o funcionalidad esperada en comparación con la sustancia correspondiente indicada, tal como un agente, un gen, un producto génico, un ácido nucleico, una proteína o un polipéptido.

La expresión "ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere típicamente a un polímero (preferentemente un polímero lineal) de cualquier longitud compuesto esencialmente de unidades nucleosídicas. Una unidad nucleosídica comúnmente incluye una base heterocíclica y un grupo de azúcar. Las bases heterocíclicas pueden incluir, entre otras, bases de purina y pirimidina tales como adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U) que están dispersas en los ácidos nucleicos de origen natural, otras bases de origen natural (por ejemplo, xantina, inosina, hipoxantina) así como bases derivatizadas o no naturales, química o biológicamente modificadas (por ejemplo, metiladas). Como nucleobases modificadas ejemplares se incluyen, sin limitación, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propinil-uracilo y 5-propinil-citosina. En particular, se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del ácido nucleico duplex y que pueden ser sustituciones de bases preferidas, por ejemplo, en agentes antisentido, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcares 2'-O-metoxietilo. Dichos grupos pueden incluir, entre otros, grupos de pentosa (pentofuranosa), tales como, preferentemente grupos de ribosa y/o 2-desoxiribosa comunes en los ácidos nucleicos de origen natural, o arabinosa, 2-desoxiarabinosa, o grupos de azúcares de treosa o hexosa, así como grupos de azúcar modificados o sustituidos (tales como, sin limitación, azúcares 2'-O-alquilados, por ejemplo, 2'-O-metilados o 2'-O-etilados tales como ribosa; azúcares 2'-O-alquiloxialquilados, por ejemplo, azúcares 2'-O-metoxietilados tales como ribosa; o azúcares ligados a 2'-O,4'-C-alquileo, por ejemplo, azúcares ligados a 2'-O,4'-C-metileno o ligados a 2'-O,4'-C ligados a etileno, tales como ribosa; 2'-fluoro-arabinosa, etc.). Las unidades nucleosídicas pueden estar ligadas entre sí mediante uno cualquiera de los numerosos enlaces internucleosídicos conocidos, incluyendo, entre ellos, enlaces fosfodiéster comunes en los ácidos nucleicos de origen natural y adicionalmente enlaces basados en fosfato o fosfonato modificado tales como fosforotioato, alquil fosforotioato tal como metil fosforotioato, fosforoditioato, alquilfosfonato tal como metilfosfonato, alquilfosfonotioato, fosfotriéster tal como alquilfosfotriéster, fosforamidato, fosforopiperazidato, fosforomorfolidato, fosforoamidato con puentes, metilfosfonato con puentes, fosforotioato con puentes; y adicionalmente siloxano, carbonato, sulfamato, carboalcoxi, acetamidato, carbamato tal como 3'-N-carbamato, morfolino, borano, tioéter, 3'-tioacetal y enlaces internucleosídicos de sulfona. Preferentemente, los enlaces internucleosídicos pueden ser enlaces basados en fosfato incluyendo enlaces basados en fosfato modificado, tal como, más preferentemente enlaces fosfodiéster, fosforotioato o fosforoditioato o combinaciones de los mismos. La expresión "ácido nucleico" también incluye cualquier otro polímero que contenga nucleobases tales como miméticos de ácidos nucleicos, incluyendo, sin limitación, ácidos péptidonucleicos (APN), ácidos péptidonucleicos con grupos fosfato (PHONA), ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos nucleicos con esqueleto morfolino fosfordiamidato (PMO), ácidos nucleicos que contienen ciclohexeno (ANCe), triciclo-ADN (tcADN) y ácidos nucleicos que tienen secciones estructurales con enlazadores alquilo o enlazadores amino (véase, por ejemplo, Kurreck 2003 (Eur J Biochem 270: 1628-1644)). "Alquilo", como se usa en el presente documento, incluye particularmente fracciones de hidratos de carbono inferior, por ejemplo, hidratos de carbono C1-C4 lineales o ramificados, saturados o insaturados, tales como, metilo, etilo, etenilo, propilo, 1-propenilo, 2-propenilo e isopropilo. Los ácidos nucleicos como se indica en el presente documento pueden incluir nucleósidos de origen natural, nucleósidos modificados o mezclas de los mismos. Un nucleósido modificado puede incluir una base heterocíclica modificada, una fracción de azúcar modificado, un enlace inter-nucleosídico modificado o una combinación de los mismos. La expresión "ácido nucleico" también incluye preferentemente moléculas de ADN, ARN e híbridos de ADN/ARN, incluyendo específicamente ARNhn, pre-ARNm, ARNm, ADNc, ADN genómico, productos de amplificación, oligonucleótidos y ADN, ARN o híbridos de ADN/ARN sintéticos (por ejemplo, sintetizados químicamente). Un ácido nucleico puede ser de origen natural, por ejemplo, estar presente o estar aislado en la naturaleza, puede ser recombinante, es decir, producido por tecnología de ADN recombinante, y/o puede sintetizarse, química o biológicamente, de un modo parcial o total. Un "ácido nucleico" puede ser bicatenario, parcialmente bicatenario, o monocatenario. Cuando es monocatenario, el ácido nucleico puede ser la cadena en sentido o la cadena antisentido. Además, el ácido nucleico puede ser circular o lineal.

Los ácidos nucleicos y particularmente los oligonucleótidos antisentido o agentes de ARNi pueden indicar en el presente documento que comprenden bases de uracilo (U). Se apreciará que la U puede opcionalmente sustituirse por timina (T) en (al menos algunos) de dichos ácidos nucleicos y agentes. Por ejemplo, dado que los nucleótidos antisentido 2'-O-metil fosforotioato son más similares a la ARN, la U puede usarse e indicarse en dichas moléculas. Con otras químicas antisentido, dichos ácidos nucleicos peptídicos o estructuras morfolino, las bases T pueden indicarse preferentemente y usarse.

La expresión "oligonucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a un oligómero o polímero de ácido nucleico (incluyendo análogos y miméticos de ácido nucleico) como se define en el presente documento. Preferentemente, un oligonucleótido, tal como más particularmente un oligonucleótido antisentido, es (sustancialmente) monocatenario. Los oligonucleótidos en la forma que se pretende en el presente documento pueden tener preferentemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 unidades nucleosídicas (es decir, nucleótidos o análogos de nucleótidos) de longitud, preferentemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50, más preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40, también preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30. Preferentemente, los oligonucleótidos como se pretende en el presente documento pueden comprender una o más o todas las bases heterocíclicas de origen no natural y/o uno o más o todos los grupos azúcar de origen no natural y/o uno o más enlaces internucleosídicos de origen no natural, cuya inclusión puede mejorar las propiedades, tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, aumento de la estabilidad en presencia de nucleasas y aumento de la afinidad de hibridación, aumento de la tolerancia para

coincidencias erróneas, etc. Adicionalmente, los oligonucleótidos como se pretende en el presente documento pueden configurarse para no activar la ARNasa H, de acuerdo con técnicas conocidas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.149.797).

5 Los agentes antisentido, tales como oligonucleótidos, como se explica en el presente documento, pueden conjugarse adicionalmente (por ejemplo, de manera covalente o no covalente, directamente o mediante un  
 10 enlazador adecuado) con uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen pero sin limitación restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo  
 15 restos dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-o-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o un ácido adamantano acético, un resto palmitilo o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

15 No es necesario modificar uniformemente todas las posiciones de un agente determinado, y de hecho más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas pueden incorporarse en un solo agente o incluso en un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido. Adicionalmente se incluyen compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos antisentido “quiméricos” o “quimeras” son moléculas antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una construida por al menos una  
 20 unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado para conferir sobre la resistencia aumentada a la degradación por nucleasas, captación celular aumentada y una región adicional para aumentar la afinidad de unión por el ácido nucleico diana.

25 El término “antisentido” generalmente se refiere a un agente (por ejemplo, un oligonucleótido) configurado para anillar específicamente con (hibridarse con) una secuencia determinada en un ácido nucleico diana, tal como, por ejemplo, un ADN diana, ARNhn, pre-ARNm o ARNm y típicamente comprende, consiste esencialmente en o consiste en una secuencia de ácido nucleico que es complementaria o sustancialmente complementaria a dicha  
 30 secuencia de ácido nucleico. Los agentes antisentido adecuados para su uso en el presente documento pueden típicamente ser capaces de anillarse con (hibridarse con) las secuencias de ácido nucleico diana respectivas en condiciones de rigurosidad altas, y capaces de hibridarse específicamente con la diana en condiciones fisiológicas.

35 Los términos “complementario” o “complementariedad”, como se usa en el presente documento con referencia a ácidos nucleicos, se refieren a la unión normal de los ácidos nucleicos monocatenarios en condiciones permisivas de salinidad (fuerza iónica) y temperatura por emparejamiento de bases, preferentemente emparejamiento de bases de Watson-Crick. Como ejemplo, el emparejamiento de bases de Watson-Crick complementarias entre las bases A y T,  
 40 A y U o G y C. Por ejemplo, la secuencia 5'-A-G-U-3' es complementaria a la secuencia 5'-A-C-U-3'.

45 El término “unir” o “unión” como se usa en el presente documento se refiere preferentemente a unión específica, es decir, en la que un agente se une a (se anilla con) una o más dianas de interés, tal como con una o más moléculas de pre-ARNm o fragmentos o variantes de las mismas, sustancialmente con la exclusión de otras moléculas que están al azar o no relacionadas y opcionalmente de modo sustancial con la exclusión de otras moléculas que están estructuralmente relacionadas. La unión de un agente con una diana puede evaluarse entre otros usando métodos de búsqueda de interacción convencional, tales como análisis de secuencia *in silico* o experimentos de hibridación de ácido nucleico por ejemplo para verificar la hibridación específica, por ejemplo, en condiciones de rigurosidad  
 50 altas.

55 La unión específica no requiere necesariamente que un agente se una exclusivamente a su diana (o dianas) deseada. Por ejemplo, puede decirse que un agente se une específicamente a un pre-ARNm determinado de interés o fragmentos o variantes del mismo si su afinidad por dicha diana (o dianas) deseada en las condiciones de unión es al menos aproximadamente 2 veces mayor, preferentemente al menos aproximadamente 5 veces mayor, más preferentemente al menos aproximadamente 10 veces mayor, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 veces mayor, aún más preferentemente al menos aproximadamente 50 veces mayor, e incluso más preferentemente al menos aproximadamente 100 veces o al menos aproximadamente 1000 veces o más mayor, en comparación con su afinidad por una molécula no diana, tal como genes *DUX* distintos no diana.

60 La secuencia de un agente antisentido no requiere ser 100 % complementario con la de su secuencia diana para unirse o hibridar específicamente con esta última. Puede decirse que un agente antisentido se hibrida específicamente cuando la unión del agente con una molécula de ácido nucleico diana interfiere con el funcionamiento normal del ácido nucleico diana de tal manera que se alcanza un resultado pretendido (por ejemplo pérdida de utilidad) y por lo tanto es un grado de complementariedad suficiente para impedir la unión no específica del agente antisentido con las secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico y en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realiza el ensayo. Por tanto, “específicamente hibridable” y “complementario” puede  
 65 indicar un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de tal manera que se produce la unión estable y específica entre un agente antisentido y una diana de ácido nucleico. Los agentes como se pretende en el presente documento se unen preferentemente de un modo específico a las dianas deseadas *DUX4* y/o *DUX4c*

sustancialmente con la exclusión de otros genes *DUX*.

Preferentemente, para garantizar la especificidad de los agentes antisentido hacia las dianas *DUX4* y/o *DUX4c* deseadas sobre las moléculas no relacionadas, tal como sobre otros genes *DUX*, la secuencia de dichos agentes antisentido pueden ser al menos aproximadamente 80 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente 90 % idéntica, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % idéntica tal como, por ejemplo, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % y hasta el 100 % idéntica con la secuencia *DUX4* y/o *DUX4c* diana respectiva.

El término “reducir” generalmente indica una alteración cualitativa y/o cuantitativa, un cambio o variación que conduce a una disminución de que se reduzca (por ejemplo, producción y/o nivel de una proteína determinada). El término incluye cualquier grado de dicha reducción. Por ejemplo, cuando la reducción afecta a una variable determinable o medible, entonces dicha reducción puede incluir una disminución en el valor de dicha variable en al menos aproximadamente el 10 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, por ejemplo, al menos aproximadamente 95 %, tal como al menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % (anulación), en comparación con una situación de referencia sin dicha reducción. Preferentemente, la reducción de la producción y/o nivel de la diana (o dianas) pretendido puede ser específica o selectiva, es decir, la producción y/o nivel de la diana (o dianas) pretendido puede modularse sin alterar sustancialmente la producción y/o el nivel de las dianas al azar, no relacionadas.

Los agentes, tales como agentes antisentido o de ARNi, como se explica en el presente documento, pueden reducir o anular sin limitación la producción y/o nivel del pre-ARNm y/o del ARNm de *DUX4* y/o *DUX4c*, mediante lo cual dichos agentes pueden ser capaces de reducir o anular la producción de las proteínas de *DUX4* y/o *DUX4c*.

La referencia al “nivel” de una diana puede incluir preferentemente la cantidad y/o la disponibilidad (por ejemplo disponibilidad para realizar su actividad biológica) de la diana, por ejemplo, dentro de una célula, tejido, órgano o un organismo.

Las expresiones “corte y empalme”, “corte y empalme de un gen” y similares como se usa en el presente documento son sinónimos y tienen su significado establecido en la técnica. Mediante una explicación adicional, corte y empalme significa el proceso y medios para retirar secuencias intermedias (intrones) del pre-ARNm, en el proceso de producción de ARNm maduro. La referencia a corte y empalme particularmente se refiere a corte y empalme nativo tal como se produce en condiciones fisiológicas normales. Las expresiones “pre-ARNm” y “transcrito” se usan en el presente documento para indicar especies de ARN que preceden al ARNm maduro, tal como en particular un transcrito de ARN primario y cualquier forma procesada parcialmente de la misma. Los elementos de secuencia necesarios para el corte y empalme se refieren particularmente a elementos *cis* en la secuencia del pre-ARNm que dirigen la maquinaria de corte y empalme celular (espliceosoma) hacia una retirada correcta y precisa de intrones del pre-ARNm. Los elementos de secuencia implicados en el corte y empalme generalmente son conocidos de por sí y pueden determinarse adicionalmente por técnicas conocidas incluyendo entre otras análisis por mutación o delección. Mediante una explicación adicional, “sitio donante de corte y empalme” o “sitio de corte y empalme 5'” generalmente se refiere a una secuencia conservada inmediatamente adyacente a un límite exón-intrón en el extremo 5' de un intrón. Normalmente, un sitio donante de corte y empalme puede contener un dinucleótido GU, y puede implicar una secuencia consenso de aproximadamente 8 bases en aproximadamente las posiciones +2 a -6. “Sitio aceptor de corte y empalme” o “sitio de corte y empalme 3'” generalmente se refiere a una secuencia conservada inmediatamente adyacente a un límite de intrón-exón en el extremo 3' de un intrón. Comúnmente, un sitio aceptor de corte y empalme puede contener un dinucleótido AG, y puede implicar una secuencia consenso de aproximadamente 16 bases en aproximadamente las posiciones -14 a +2 (véase, por ejemplo, la Figura 1 del documento WO 2006/00057 para secuencias consenso ilustrativas de sitios aceptores de corte y empalme y donantes de corte y empalme).

Las expresiones “poliadenilación” y “poliadenilación de un gen” y similares se usan indistintamente en el presente documento y tienen su significado establecido en la técnica. Mediante una explicación adicional, poliadenilación significa el proceso y medio para añadir una cola de ácido poliadenílico (poli(A)), es decir, adenosín monofosfatos múltiples, a una molécula de ARN. En particular, la poliadenilación puede indicar el proceso y medio de adición de una cola poli(A) a una molécula de pre-ARNm, en el proceso de la producción del ARNm maduro. La referencia a poliadenilación particularmente indica una poliadenilación nativa tal como se produce en condiciones fisiológicas normales.

Los elementos de secuencia necesarios para la poliadenilación se refieren particularmente a elementos en *cis* en la secuencia de pre-ARNm que la maquinaria de poliadenilación celular reconoce tales como a los que se une, tal como por ejemplo la señal de poliadenilación. Estas secuencias tales como la señal de poliadenilación pueden variar entre grupos de eucariotas. Por ejemplo, en seres humanos, la secuencia de señal de poliadenilación puede ser típicamente AATAAA (es decir, AAUAAA en ARN, tal como pre-ARNm), aunque existen variantes de ella, tales como ATTAAA.

La expresión “péptido penetrador de células” o “PPC” generalmente se refiere a péptidos capaces de entrar en las células. Esta capacidad puede aprovecharse para suministrar en las células agentes como se desvela en el presente documento. Los PPC ejemplares pero no limitantes incluyen PPC procedente de Tat del VIH-1 (véase, por ejemplo, Frankel *et al.* 1988 (Science 240: 70-73)); péptidos de Antennapedia o penetratinas (véase, por ejemplo, Derossi *et al.* 1994 (J Biol Chem 269: 10444-10450)); péptidos procedentes de VP22 del HSV-1 (véase, por ejemplo, Aints *et al.* 2001 (Gene Ther 8: 1051-1056)); transportans (véase, por ejemplo, Pooga *et al.* 1998 (FASEB J 12: 67-77)); protegrina 1 (PG-1) péptido antimicrobiano SynB (Kokryakov *et al.* 1993 (FEBS Lett 327: 231-236)); péptidos anfipáticos modelo (MAP) (véase, por ejemplo, Oehlke *et al.* 1998 (Biochim Biophys Acta 1414: 127-139)); péptidos penetradores de células basados en secuencias de señal (NLS) (véase, por ejemplo, Lin *et al.* 1995 (J Biol Chem 270: 14255-14258)); péptidos de secuencia de translocación de membrana hidrófoba (MTS) (véase, por ejemplo, Lin *et al.* 1995, citado anteriormente); y péptidos ricos en poliarginina, oligoarginina y arginina (véase, por ejemplo, Futaki *et al.* 2001 (J Biol Chem 276: 5836-5840)). Los péptidos transportadores que proceden de estas proteínas muestran escasa homología de secuencia entre sí, pero son muy catiónicos y ricos en arginina o lisina.

Los PPC pueden tener cualquier longitud. Por ejemplo, el PPC puede ser menor que o igual a 500, 250, 150, 100, 50, 25, 10 o 6 aminoácidos de longitud, por ejemplo el PPC puede ser mayor que o igual a 4, 5, 6, 10, 25, 50, 100, 150 o 250 de aminoácidos de longitud. Preferentemente, un PPC puede tener entre 4 y 25 aminoácidos de longitud. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente la longitud adecuada y el diseño del PPC. Como una referencia general sobre los PPC puede servir, entre otros, los “Cell penetrating peptides: processes and applications” (ed. Ulo Langel, 1ª ed., CRC Press 2002); Advanced Drug Delivery Reviews 57: 489-660 (2005); Dietz y Bahr 2004 (Moll Cell Neurosci 27: 85-131)).

Un agente como se desvela en el presente documento puede conjugarse con un PPC directa o indirectamente, por ejemplo, mediante un enlazador adecuado, tal como sin limitación un enlazador basado en PEG. En la técnica se conoce la tecnología de “interferencia de ARN” o “ARNi”, y se refiere generalmente al proceso y medio de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia mediado particularmente por ácidos nucleicos de interferencia cortos (NAic). Para una explicación sobre las moléculas de ARNi y su diseño, véanse, entre otros, Elbashir *et al.* 2001 (Nature 411: 494-501), Reynolds *et al.* 2004 (Nat Biotechnol 22: 326-30), <http://rnaidesigner.invitro-gen.com/rnaexpress>, Wang y Mu 2004 (Bioinformatics 20: 1818-20), Yuan *et al.* 2004 (Nucleic Acids Res 32(Web Server issue): W130-4), por M Sohail 2004 (“Gene Silencing by RNA Interference: Technology and Application”, 1ª ed., CRC, ISBN 0849321417), U Schepers 2005 (“RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in C.elegans, Drosophila, and Mammals”, 1ª ed., Wiley-VCH, ISBN 3527310207), y DR Engelke y JJ Rossi 2005 (“Methods in Enzymology, Volumen 392: RNA Interference”, 1ª ed., Academic Press, ISBN 0121827976).

Un agente ARNi típicamente comprende, consiste esencialmente en o consta de una porción o región bicatenaria (independientemente de la presencia opcional y posiblemente preferida de salientes monocatenarios) de cadenas complementarias hibridadas, una de las cuales tiene una secuencia correspondiente a una secuencia de nucleótidos diana (por tanto, a al menos una parte de un ARNm) del gen diana para regular negativamente. La otra cadena del agente ARNi es complementaria a dicha secuencia de nucleótido diana.

Mientras que la secuencia de un agente ARNi no necesita ser completamente idéntica a una secuencia diana para regularse negativamente, el número de coincidencias erróneas entre una secuencia diana y una secuencia de nucleótidos del agente ARNi es preferentemente no más de 1 en 5 bases, o de 1 en 10 bases o de 1 en 20 bases, o de 1 en 50 bases.

Preferentemente, para garantizar la especificidad de los agentes de ARNi hacia las dianas *DUX4* y/o *DUX4c* deseadas sobre moléculas no relacionadas, tal como sobre otros genes *DUX*, la secuencia de dichos agentes de ARNi puede ser al menos aproximadamente 80 % idéntica, preferentemente al menos aproximadamente 90 % idéntica, más preferentemente al menos aproximadamente 95 % idéntica, tal como, por ejemplo, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 % y hasta 100 % idéntica, a la diana respectiva de la secuencia de *DUX4* y/o *DUX4c*.

Un agente ARNi puede formarse por cadenas en sentido y antisentido separadas o, como alternativa, mediante una cadena común que proporciona un bucle-tallo de plegado o un diseño en horquilla en el que las dos cadenas hibridadas de un agente ARNi están unidas por enlace covalente.

Una molécula de ARNi puede producirse típicamente, por ejemplo, sintetizarse, como una molécula bicatenaria de cadenas distintas, sustancialmente complementarias, en la que cada cadena tiene longitud de aproximadamente 18 a aproximadamente 35 bases, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 30 bases, más preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 25 bases e incluso más preferentemente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 bases.

El ARNh<sub>c</sub> está en forma de una estructura en horquilla. El ARNh<sub>c</sub> puede sintetizarse exógenamente o puede formarse mediante la transcripción de promotores de ARN polimerasa III *in vivo*. Preferentemente, los ARNh<sub>c</sub> pueden modificarse por ingeniería genética en células u organismos hospedadores para garantizar la supresión

continua y estable de un gen deseado. Se sabe que el ARNiC puede producirse por procesamiento del ARN en horquilla en células.

5 Los agentes de ARNi como se pretende en el presente documento pueden incluir cualquiera de las modificaciones expuestas en el presente documento para ácidos nucleicos y oligonucleótidos, para mejorar sus propiedades terapéuticas.

10 En las realizaciones, al menos una cadena de una molécula de ARNi puede tener un saliente 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 6 bases de longitud, por ejemplo, de 2 a 4 bases, más preferentemente de 1 a 3 bases. Por ejemplo, una cadena puede tener un saliente 3' y la otra cadena puede tener un extremo romo o también puede tener un saliente 3'. La longitud de los salientes puede ser igual o diferente en cada cadena. Los salientes 3' pueden estabilizarse contra la degradación. Por ejemplo, el ARN puede estabilizarse incluyendo nucleótidos de purina, tales como nucleótidos A o G. Como alternativa, la sustitución de nucleótidos de pirimidina por análogos modificados, por ejemplo, sustitución de salientes en 3' U por 2'-desoxitimidina se tolera y no afecta a la  
15 eficacia del ARNi.

Una molécula de ARNiC ejemplar pero no limitante puede caracterizarse mediante cualquiera de una o más, y preferentemente mediante los siguientes criterios:

- 20 - al menos aproximadamente una identidad de secuencia del 80 %, más preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % o de al menos aproximadamente 97 % con el ARNm diana, por ejemplo ARNm de *DUX4* y/o *DUX4c*;
- 25 - tener una secuencia que se dirija a un área del gen diana presente en el ARNm maduro (por ejemplo, un exón o como alternativa un intrón cortado y empalmado);
- mostrar una preferencia de direccionamiento del extremo 3' del gen diana.

El ARNiC ejemplar puede caracterizarse adicionalmente por uno o más o todos los siguientes criterios:

- 30 - tener un ácido nucleico bicatenario con una longitud entre 16 y 30 bases y preferentemente entre 18 y 23 bases, y preferentemente de 19 nucleótidos;
- 35 - tener un contenido G-C entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 %
- tener una secuencia TT (T) en el extremo 3';
- no mostrar estructura secundaria cuando se adopte la forma dúplex;
- 40 - tener una Tf (temperatura de fusión) menor de 20 °C
- tener los nucleótidos indicados en el presente documento debajo en la secuencia de los nucleótidos en el que "h" es A, C, T/U pero no G; en el que "d" es A, G, T/U pero no C, y en el que "w" es A o T/U, pero no G o C:

	-	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	-	-	
ARNm	A	A		A							U			h						w			3'-OH
ic-Antisentido	T			U							A			d						w			5'-P
ic-Sentido				A							U			h						w	T	T	3'-OH

- La producción de agentes como se indica en el presente documento, tales como agentes antisentido y agentes de ARNi, puede realizarse mediante cualquier proceso conocido en la técnica, tal como, entre otros, síntesis parcial o completamente química (por ejemplo, síntesis en fase sólida habitualmente conocida; un método ejemplar y no limitante para sintetizar oligonucleótidos en un soporte sólido modificado se describe en el documento US 4.458.066; en otro ejemplo, se usa dietilfosforamidita como material de partida y puede sintetizarse como se describe en Beaucage *et al.* 1981 (Tetrahedron Letters 22: 1859- 1862)), o parcial o completamente mediante síntesis bioquímica (Enzimática), por ejemplo, mediante transcripción *in vitro* de una construcción de ácido nucleico (molde) usando una polimerasa adecuada tal como una polimerasa de T7 o SP6 ARN, o por técnicas de ácido nucleico recombinante, por ejemplo expresión de un vector en una célula hospedadora o en un organismo hospedador. Pueden introducirse análogos nucleotídicos mediante síntesis química o bioquímica *in vitro*. En un ejemplo, los agentes antisentido de la memoria descriptiva se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico, o construcciones de vectores genéticos diseñados para dirigirse a la síntesis *in vivo* de moléculas antisentido.
- El término “aislado” con referencia a un componente particular (tal como, por ejemplo, un ácido nucleico) generalmente indica que dicho componente existe en separación de - por ejemplo, se ha separado de o preparado y/o mantenido en separación de - uno o más componentes distintos de su entorno natural. Por ejemplo, un ácido nucleico de ser humano o de animal aislado puede existir en separación de un cuerpo animal o humano en el que se produce en la naturaleza.
- El término “aislado” como se usa en el presente documento también puede incluir preferentemente el calificador “purificado”. Como ejemplo, el término “purificado” con referencia a una sustancia (por ejemplo, un agente o un ácido nucleico) no requiere absoluta pureza. En su lugar, significa que dichas sustancias están en un entorno separado en el que su abundancia (convenientemente expresada en términos de masa o peso o concentración) relativa con otras sustancias relevantes es mayor que en una muestra biológica. Un entorno distinto significa un medio único, tal como, por ejemplo, una única solución, gel, precipitado, liofilizado etc. Las sustancias purificadas pueden obtenerse por métodos conocidos incluyendo, por ejemplo, síntesis en laboratorio o recombinante, cromatografía, electroforesis preparativa, centrifugación, precipitación, purificación por afinidad, etc.
- Como ejemplo y sin limitación, los ácidos nucleicos purificados (incluyendo agentes que comprenden NA o basados en NA) pueden constituir preferentemente en peso  $\geq$  aproximadamente 10 %, más preferentemente  $\geq$  aproximadamente 50 %, tal como  $\geq$  aproximadamente 60 %, incluso más preferentemente  $>$  aproximadamente 70 %, tal como  $>$  aproximadamente 80 % y aún más preferentemente  $\geq$  aproximadamente 90 %, tal como  $\geq$  aproximadamente 95 %,  $\geq$  aproximadamente 96 %,  $\geq$  aproximadamente 97 %,  $\geq$  aproximadamente 98 %,  $\geq$  aproximadamente 99 % o incluso 100 %, del contenido de ácido nucleico del entorno separado. Por ejemplo, la pureza de un ácido nucleico puede determinarse midiendo la absorbancia  $A_{260}/A_{280}$ . Además, un ácido nucleico aislado puede purificarse hasta la homogeneidad como se determina mediante electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida y bromuro de etidio o tinciones similares.
- Por “que codifica” se entiende particularmente que una secuencia de ácido nucleico o parte de la misma se corresponde a otra secuencia de ácido nucleico en una relación de molde - producto de transcripción (por ejemplo, ARN o análogo de ARN), o corresponde, en virtud del código genético de un organismo en cuestión, a una secuencia de aminoácidos particular, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de una o más proteínas o polipéptidos deseados.
- Preferentemente, un ácido nucleico que codifica una o más proteínas o polipéptidos puede comprender una fase de lectura abierta (ORF), *open reading frame* que codifica dicha proteína o polipéptido. Una “fase de lectura abierta” u “ORF” se refiere a una sucesión de tripletes nucleotídicos codificantes (codones) que comienzan con un codón de iniciación de la traducción y finalizan con un codón de terminación de la traducción, conocidos de por sí, y que no contienen ningún codón de terminación de la traducción en fase interna, y posiblemente capaces de codificar una proteína o polipéptido. Por tanto, el término puede ser sinónimo a “secuencia codificante” como se usa en la técnica.
- La expresión de productos de transcripción o proteínas y polipéptidos puede realizarse a través de secuencias de ácido nucleico unidas operativamente o las ORF que codifican los productos o proteínas y polipéptidos de transcripción pretendidos con secuencias reguladoras que permiten la expresión de los ácidos nucleicos o las ORF, por ejemplo, *in vitro*, en una célula hospedadora, órgano hospedador y/u organismo hospedador. Dicha expresión puede realizarse, por ejemplo, en condiciones adecuadas (cultivo) o después de la adición de inductores (por ejemplo, en las que se usan secuencias reguladoras inducibles).
- Una “unión operativa” es una unión en la que las secuencias reguladoras y las secuencias que se quieren expresar están conectadas de tal manera que se permite dicha expresión. Por ejemplo, secuencias tales como, por ejemplo, un promotor y una ORF, se dice que pueden estar unidas operativamente si la naturaleza de la unión entre dichas secuencias no: (1) dan como resultado la introducción de una mutación de cambio de fase, (2) interfieren con la capacidad del promotor para dirigir la transcripción de la ORF, (3) interfiere con la capacidad de la ORF para transcribirse a partir de la secuencia promotora.

La naturaleza exacta de las secuencias reguladoras o elementos necesarios para la expresión puede variar entre entornos de expresión, pero típicamente pueden incluir un promotor y un terminador de la transcripción y opcionalmente un potenciador, como se conoce de por sí.

5 El término “vector” generalmente se refiere a una molécula de ácido nucleico, típicamente ADN, en la que pueden insertarse y clonarse segmentos de ácido nucleico, es decir, propagarse. Por tanto, un vector típicamente contendrá uno o más sitios de restricción exclusivos, y puede ser capaz de realizar replicación autónoma en un hospedador  
10 definido u organismo vehículo de tal manera que la secuencia clonada sea reproducible. Los vectores pueden incluir, sin limitación, plásmidos, fagémidos, bacteriófagos, vectores procedentes de bacteriófagos, PAC, BAC, ácidos nucleicos lineales, por ejemplo ADN lineal, vectores víricos, etc., según sea apropiado. Los vectores de expresión se configuran generalmente para permitir y/o efectuar la expresión de los ácidos nucleicos u ORF introducidos en los mismos en un sistema de expresión deseado, por ejemplo, *in vitro*, en una célula hospedadora, organismo hospedador y/u organismo hospedador. Por ejemplo, los vectores de expresión pueden comprender ventajosamente secuencias reguladoras adecuadas.

15 Los vectores preferidos para su uso en el presente documento son vectores víricos, que son muy conocidos e incluyen vectores procedentes por ejemplo, pero sin limitación, de retrovirus, virus de la vacuna, poxvirus, adenovirus y virus adenoasociados (AAV). Dichos vectores víricos pueden modificarse por ingeniería genética mediante técnicas recombinantes conocidas por sí mismas para introducir en los mismos, secuencias de ácido  
20 nucleico que codifican uno cualquiera de los agentes antisentido o ARNi desvelados en el presente documento.

Por ejemplo, en el presente documento puede usarse un vector retrovítico. Generalmente, los vectores retrovíticos pueden comprender las secuencias genómicas retrovíticas que codifican componentes necesarios para la integración del genoma vírico recombinante (al azar) en el genoma de la célula hospedadora y la secuencia o  
25 secuencias de ácido nucleico de interés, tal como en particular la secuencia (o secuencias) de ácido nucleico que codifican uno cualquiera de los agentes antisentido o ARNi desvelados en el presente documento. Dichos vectores retrovíticos pueden construirse fácilmente usando técnicas recombinantes convencionales (por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) de una amplia variedad de retrovirus, incluyendo, por ejemplo, retrovirus de tipo B, C y D así como espumavirus y lentivirus (véase  
30 RNA Tumor Viruses, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985).

También se pueden contemplar vectores adenovíricos recombinantes para el suministro y expresión de agentes antisentido o ARNi desvelados en el presente documento en una célula hospedadora. Los vectores víricos basados en adenovirus tienen la ventaja de poder infectar células hospedadoras que no están en división, pero el genoma  
35 vírico recombinante no se integra en el genoma de la célula hospedadora. Por ejemplo, un vector adenovírico adecuado, un método para construir un vector adenovírico recombinante del mismo y un método para suministrar el vector recombinante en las células hospedadoras, se describen en Xia H *et al.* (2002) (Nat. Biotech. 20: 1006-1010). El uso de vectores recombinantes AAV (RAAV) también se contempla en el presente documento. Los vectores RAAV pueden infectar células tanto en división como no en división y pueden incorporar su genoma vírico recombinante en el de la célula hospedadora. Los vectores RAAV pueden generarse a partir de diversos virus adenoasociados, incluyendo, por ejemplo, de los serotipos 1 a 6. Generalmente, los vectores RAAV pueden comprender, en orden, una repetición terminal invertida de un virus adenoasociado 5' (ITR), un ácido nucleico de interés, tal como en particular un ácido nucleico que codifica uno cualquiera de los agentes antisentido o ARNi desvelados en el presente documento, unido operativamente a una secuencia que regula su expresión en una célula  
45 hospedadora u organismo hospedador, y una ITR de virus adenoasociado 3'. Además, el vector rAAV puede tener preferentemente una señal de poliadenilación. En los documentos WO 1994/13788, WO 1993/24641, y en Goyenvalle *et al.* 2004 (Science 306: 1796-1799), se describen entre otros vectores RAAV adecuados en los que las secuencias antisentido están ligadas a un ARN nuclear pequeño U7 modificado.

50 Otros vectores víricos preferidos para su uso en el presente documento son vectores procedentes de un poxvirus, tal como un virus de la vacuna, por ejemplo, un virus de la vacuna atenuado tal como el Virus de Ankara Modificado (MVA) o NYVAC, un virus avipox tal como virus de la viruela aviar o virus de la viruela de los canarios.

Las expresiones “célula hospedadora” y “organismo hospedador” pueden referirse adecuadamente a células u  
55 organismos que incluyen tanto procariotas, tales como bacterias, como eucariotas, tales como levaduras, hongos, protozoos, plantas y animales. Como células hospedadoras contempladas están entre otros organismos unicelulares, tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens* o *Bacillus subtilis*), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*), células vegetales (cultivadas) (por ejemplo, de *Arabidopsis thaliana* o *Nicotiana tabacum*) y células animales (cultivadas) (por ejemplo, células de animales vertebrados, células de mamífero, célula de primate, células de seres humanos o células de insecto). Como organismos hospedadores se contemplan entre otros organismos multicelulares, tales como plantas y animales, preferentemente animales, más preferentemente animales de sangre caliente, incluso más preferentemente animales vertebrados, aún más preferentemente mamíferos, incluso más preferentemente primates; se contemplan particularmente animales de este tipo y a categorías de animales que no son humanos.

65

La referencia a agentes antisentido y a agentes de ARNi como se usa en el presente documento también incluye cualquier sal, ésteres o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, después de la administración a un animal, incluyendo un ser humano, puede proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o resto del mismo biológicamente activo. Por consiguiente, por ejemplo, también se incluyen en la divulgación profármacos y sales de los compuestos de la memoria descriptiva farmacéuticamente aceptables, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes.

La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los agentes desvelados en el presente documento, en el que dichas sales conservan la actividad biológica deseada del agente precursor y no confieren efectos toxicológicos no deseados a los mismos. Para los oligonucleótidos, los ejemplos preferidos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen pero sin limitación (a) sales formadas con cationes tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc.; (b) sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; (c) sales formadas con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido alginico, ácido poliglútamico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalendisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; y (d) sales formadas de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo.

Las diversas sustancias activas de la presente divulgación, tales como, entre otros, agentes antisentido, agentes de ARNi, vectores y células como se describe en el presente documento o derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos pueden formularse en composiciones farmacéuticas o formulaciones con uno o más transportadores/excipientes farmacéuticamente aceptables.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” como se usa en el presente documento es coherente con la técnica y significa compatible con los otros principios de la composición farmacéutica y no perjudicial al receptor del mismo.

Como se usa en el presente documento, “transportador” o “excipiente” incluye todos y cada uno de los disolventes, diluyentes, tampones (tales como, por ejemplo, solución salina tamponada neutra, solución salina tamponada con fosfato u opcionalmente tampones de Tris-HCl, acetato o fosfato), solubilizantes (tales como, por ejemplo, Tween 80, Polisorbato 80), coloides, medios de dispersión, vehículos, cargas, agentes quelantes (tales como, por ejemplo, EDTA o glutatión), aminoácidos (tales como, por ejemplo, glicina), proteínas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saporíferos, aromatizantes, espesantes, agentes para conseguir un efecto depósito, recubrimientos, agentes anti fúngicos, conservantes (tal como, por ejemplo, Thimerosal™, alcohol bencílico), antioxidantes (tales como, por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito sódico), agentes controladores de la tonicidad, agentes retardantes de la absorción, adyuvantes, agentes formadores de volumen (tales como, por ejemplo, lactosa, manitol) y similares. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticas activas es muy conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con la sustancia activa, su uso en las composiciones terapéuticas puede contemplarse. Los transportadores farmacéuticos adecuados se describen entre otros en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990).

Los transportadores ilustrativos no limitantes para su uso en la formulación de las composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, composiciones acuosas con o sin la inclusión de codisolventes orgánicos adecuados para su uso intravenoso (IV), liposomas o vesículas que contienen tensoactivo, preparaciones de partículas con compuestos poliméricos, tales como, entre otros, ácido poliláctico o ácido poliglicólico, microesferas, microperlas y microsomas, polvos, comprimidos, cápsulas, supositorios, suspensiones acuosas, aerosoles y otros transportadores obvios para un experto habitual en la técnica.

Los transportadores farmacéuticos pueden comprender líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los del petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de semilla de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la memoria descriptiva puede formularse para esencialmente cualquier vía de administración, tal como sin limitación, administración oral (tal como, por ejemplo, ingestión oral o inhalación) administración intranasal (tal como, por ejemplo, inhalación intranasal o aplicación mucosa intranasal), pulmonar (tal como, por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles), administración parenteral (tal como, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, intraperitoneal o intraesternal o infusión o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular), administración epidérmica y transdérmica, o transmucosa (tal como, por ejemplo, oral, sublingual, intranasal), administración tópica (incluyendo entre otras administración oftálmica), rectal, vaginal o instilación intratraqueal y similar. De este modo, los efectos terapéuticos conseguibles por los métodos y composiciones de la memoria descriptiva pueden ser, por ejemplo, sistémicos, locales, específicos de tejido, etc., dependiendo de la necesidad específica de una aplicación determinada de la memoria descriptiva. Se piensa que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo son particularmente útiles para la administración oral.

Por ejemplo, para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos lacados, comprimidos recubiertos (por ejemplo, recubiertos con azúcar), gránulos, cápsula de gelatina blanda y dura, soluciones acuosas, alcohólicas u oleaginosas, jarabes, emulsiones o suspensiones. En un ejemplo, sin limitación, la preparación de formas de dosificación oral puede realizarse adecuadamente mezclando de manera uniforme e íntima entre sí una cantidad adecuada del compuesto activo en forma de un polvo, opcionalmente también incluyendo uno o más transportadores finamente divididos sólidos y formulando la mezcla en una píldora, comprimido o una cápsula. Los transportadores sólidos ejemplares, pero no limitantes, incluyen fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares (tales como, por ejemplo, glucosa, manosa, lactosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (tales como, por ejemplo, manitol), dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidona, ceras de baja fusión y resinas de intercambio iónico. Los comprimidos elaborados por compresión que contienen la composición farmacéutica pueden prepararse mezclando de manera uniforme e íntima el principio activo con un transportador sólido tal como se ha descrito anteriormente para proporcionar una mezcla que tiene las propiedades de compresión necesarios y después compactando la mezcla en una máquina adecuada para dar forma y tamaño deseado. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada, una mezcla de un compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los transportadores adecuados para las cápsulas de gelatina blanda y supositorios son, por ejemplo, grasas, ceras, polioles semisólidos y líquidos, aceites naturales o endurecidos, etc.

Por ejemplo, para la administración oral o nasal por aerosol o inhalación, las composiciones farmacéuticas pueden formularse con transportadores ilustrativos, tales como, por ejemplo, en solución con solución salina, polietilenglicol o glicoles, DPPC, metilcelulosa o en mezcla con agentes dispersantes en polvo, que adicionalmente emplean alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes conocidos en la técnica. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración en forma de aerosoles o pulverizadores son, por ejemplo, soluciones, suspensiones o emulsiones de los compuestos de la memoria descriptiva o sus sales fisiológicamente tolerables en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como etanol o agua, o una mezcla de dichos disolventes. Si se desea, la formulación también puede contener adicionalmente otros adyuvantes farmacéuticos tales como tensioactivos, emulsionantes y estabilizantes, así como un propulsor. De modo ilustrativo, la administración puede ser mediante el uso de un dispositivo de administración de un solo uso, un nebulizador de bruma, un inhalador en polvo activado por respiración, un inhalador de dosis medida en aerosol (MDI) o cualquier otro de los numerosos dispositivos de liberación nebulizadores disponibles en la técnica. Adicionalmente, también puede usarse la administración con máscara o directa a través de tubos endotraqueales.

Ejemplos de transportadores para administración mediante superficies mucosas dependen de la vía particular, por ejemplo, oral, sublingual, intranasal, etc. Cuando se administran por vía oral, los ejemplos ilustrativos incluyen grados farmacéuticos de manitol, almidón, lactosa, estearato de magnesio, sacárido sódico, celulosa, carbonato de magnesio y similares, siendo preferido el manitol. Cuando se administran por vía intranasal, los ejemplos ilustrativos incluyen polietilenglicol, fosfolípidos, glicoles y glicolípidos, sacarosa y/o metilcelulosa, suspensiones en polvo con o sin agentes formadores de volumen tales como lactosa y conservantes tales como cloruro de benzalconio, EDTA. En un ejemplo particularmente ilustrativo, el fosfolípido 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) se usa como un transportador acuoso isotónico a aproximadamente 0,01-0,2 % para administración intranasal del compuesto de la memoria descriptiva sujeto a una concentración de aproximadamente 0,1 a 3,0 mg/ml.

Por ejemplo, para administración parenteral, las composiciones farmacéuticas pueden formularse ventajosamente como soluciones, suspensiones o emulsiones con disolventes, diluyentes, solubilizantes o emulsionantes, etc., adecuados. Los disolventes adecuados son, sin limitación, agua, solución salina fisiológica o alcoholes, por ejemplo, etanol, propanol, glicerol, además también soluciones en azúcar tales como glucosa, azúcar invertido, sacarosa o soluciones de manitol, o como alternativa mezclas de los diversos disolventes mencionados. Las soluciones o suspensiones inyectables pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida, usando cualquier diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable adecuado, tal como manitol, 1,3-butanodiol, agua, solución de Ringer o solución isotónica de cloruro de sodio, o agentes de suspensión y humectación o dispersantes adecuados, tales como aceites estériles, insípidos, no volátiles, incluyendo mono- o diglicéridos sintéticos y ácidos grasos incluyendo ácido oleico. Los compuestos y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos de la memoria descriptiva también pueden liofilizarse y el liofilizado obtenido usarse, por ejemplo, para la producción de preparaciones para inyección e infusión. Por ejemplo, un ejemplo ilustrativo de un transportador para uso intravenoso incluye una mezcla de USP etanol al 10 %, USP propilenglicol al 40 % o polietilenglicol 600 y el agua para inyección (WFI) USP en equilibrio. Otros transportadores ilustrativos para el uso intravenoso incluyen USP etanol al 10 % y USP WFI; trietanolamina al 0,01-0,1 % en WFI USP; o dipalmitoil difosfatidilcolina al 0,01-0,2 % en WFI USP; y escualeno o emulsión de aceite en agua vegetal parenteral al 1-10 %. El agua o soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol pueden emplearse preferentemente como transportadores, particularmente para soluciones inyectables. Los ejemplos ilustrativos de transportadores para uso subcutáneo o intramuscular incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa al 5 % en WFI y trietanolamina 0,01-0,1 % en dextrosa al 5 % o cloruro de sodio al 0,9 % en WFI USP o una mezcla de 1 a 2 o de 1 a 4 de etanol USP al 10 %, propilenglicol al 40 % y la solución isotónica aceptable en equilibrio tal como dextrosa al 5 % o cloruro de sodio al 0,9 %; o dipalmitoil fosfatidilcolina al 0,01-0,2 % en WFI USP y de 1 al 10 % de escualeno o emulsiones de aceite en agua vegetal parenteral.

Cuando se prefieren formulaciones acuosas, estas pueden comprender uno o más tensioactivos. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de una dispersión micelar que comprende al menos un tensioactivo adecuado, por ejemplo, un tensioactivo de fosfolípido. Ejemplos ilustrativos de fosfolípidos incluyen diacil fosfatidil glicerol, tales como dimiristoil fosfatidil glicerol (DPMG), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG), y distearoil fosfatidil glicerol (DSPG), diacil fosfatidil colinas, tal como dimiristoil fosfatidilcolina (DPMC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC), y distearoil fosfatidilcolina (DSPC); ácidos diacil fosfatídicos, tales como ácido dimiristoil fosfatídico (DPMA), ácido dipanitoil fosfatídico (DPPA), ácido distearoil fosfatídico (DSPA); y diacil fosfatidil etanolaminas tales como dimiristoil fosfatidil etanolamina (DPME), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPE) y distearoil fosfatidil etanolamina (DSPE). Típicamente, una proporción molar de sustancia tensioactiva:activa en una formulación acuosa será de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:10, más típicamente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 1:5, sin embargo, cualquier cantidad eficaz de tensioactivo puede usarse en una formulación acuosa para adecuar mejor los objetivos específicos de interés.

Cuando la administración se realiza por vía rectal en forma de supositorios, estas formulaciones pueden prepararse mezclando los compuestos de acuerdo con la memoria descriptiva con un excipiente no irritante adecuado, tal como, manteca de coco, ésteres de glicéridos sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas ordinarias, pero se licuan y/o se disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

Los transportadores adecuados para microcápsulas, implantes o varillas son, por ejemplo, copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico.

Un experto en la técnica reconocerá que la descripción anterior es ilustrativa en lugar de exhaustiva. De hecho, los expertos en la técnica conocen bien muchas técnicas de formulaciones adicionales y excipientes y soluciones transportadoras farmacéuticamente aceptables, así como el desarrollo de la dosificación adecuada y regímenes de tratamientos para uso de las composiciones particulares descritas en el presente documento en diversos regímenes de tratamiento.

Adicionalmente, existen varios métodos bien conocidos de introducción de ácidos nucleicos (por ejemplo, agentes antisentido y ARNi) en células animales, cualquiera de los cuales puede usarse en el presente documento. En el caso más simple, el ácido nucleico puede inyectarse directamente en la célula diana/tejido diana. Otros métodos incluyen la fusión de la célula receptora con protoplastos bacteriales que contengan el ácido nucleico, el uso de composiciones como cloruro de calcio, cloruro de rubidio, cloruro de litio, fosfato de calcio, DEAE dextrano, lípidos catiónicos o liposomas o métodos de tipo endocitosis mediada por receptores, bombardeo con partículas biolísticas, (método de "pistola génica"), infección con vectores víricos, por ejemplo, como se exhibe en el presente documento, electroporación y similares. Otras técnicas o métodos que son adecuados para administrar las moléculas de ácido nucleico en las células diana incluyen la administración continua de una molécula NA de microesferas poliméricas de poli (ácido láctico-Co-Glicólico) o la inyección directa de una o más moléculas NA protegidas (estabilizadas) en microbombas que suministran el producto. Otra posibilidad es el uso de microesferas biodegradables de liberación de fármaco implantables. También se contempla la encapsulación de NA en diversos tipos de liposomas (inmunoliposomas, liposomas (inmuno) PEGilados), lípidos y polímeros catiónicos, nanopartículas o dendrímeros, microesferas poliméricas de poli (ácido láctico co-glicólico), microesferas biodegradables de liberación de fármaco implantable, etc.; y coinyección de NA con un agente protector como ácido aurintricarboxílico inhibidor de nucleasa. Será obvio que también pueda usarse una combinación de diferentes modos y métodos de administración anteriormente mencionados.

Un método preferido de administración intracelular de los agentes antisentido y de los agentes de ARNi desvelados en el presente documento, puede incluir la infección con vectores víricos como se explica en el presente documento. En dicho método, un vector vírico recombinante como se explica en el presente documento, se pone en contacto con una célula hospedadora, tal como introduciéndose (por ejemplo, local o sistemáticamente) en un organismo hospedador, e incubándose en condiciones favorables para la infección vírica y, por tanto, hace uso de la capacidad natural de un virus para infectar una célula. Por ejemplo, un retrovirus obtiene la entrada en una célula hospedadora mediante la interacción de una proteína retrovírica con una proteína transmembrana que actúa como un receptor sobre la superficie de la célula hospedadora. Otra estrategia de suministro mediada por vectores víricos de los agentes antisentido y ARNi como se desvela en el presente documento puede incluir una técnica basada en la entrada celular física tal como, por ejemplo, el uso de ultrasonido y microburbujas en combinación con suministro mediado por vectores víricos como se describe en el documento WO 2006/129080.

Otros modos de suministro de ácidos nucleicos tales como agentes antisentido y agentes de ARNi, pueden emplear métodos previamente publicados. Por ejemplo, el suministro intracelular de los ácidos nucleicos puede ser mediante una composición que comprenda una mezcla de la molécula de ácido nucleico y una cantidad eficaz de un copolímero de bloque. Un ejemplo de este método se describe en el documento US 2004/0248833.

Otros métodos de suministro de ácidos nucleicos en los núcleos se describen en Mann *et al.* 2001 (Proc Natl Acad Science 98(1): 42-47) y en Gebiski *et al.* 2003 (Human Molecular Genetics 12(15): 1801-1811).

Un método para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula mediante un vector de expresión bien como ADN desnudo o formando complejo con transportadores lipídicos se describe en el documento US 6.806.084.

Puede ser deseable administrar una molécula de ácido nucleico en un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidales incluyen complejos de macromolécula, nanocápsulas, microesferas, perlas y sistemas basados en lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas o formulaciones de liposomas. Los liposomas son vesículas de membrana artificiales que son útiles como vehículos de suministro *in vitro* o *in vivo*. Estas formulaciones pueden tener características de carga neta catiónica, aniónica o neutra y son características útiles con métodos de suministro *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Se ha observado que vesículas unilaminadas (VUL) grandes, cuyo tamaño varía de 0,2-4,0  $\mu\text{m}$  pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contenga macromoléculas grandes. El ARN y el ADN pueden encapsularse en el interior acuoso y suministrarse a las células en una forma biológicamente activa (Fraley *et al.* 1981 (Trends Biochem Sci 6: 77)).

Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, debe presentar las siguientes características: (1) encapsulación de la molécula de ácido nucleico de interés a alta eficacia sin comprometer su actividad biológica; (2) unión preferencial y sustancial a una célula diana en comparación con células no diana; (3) suministro del contenido acuoso de la vesícula en el citoplasma de la célula diana a alta eficacia y (4) expresión precisa y eficaz de la información genética (Mannino *et al.* 1988 (Biotechniques 6: 682)).

La composición del liposoma es normalmente una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos de alta temperatura de transición de fase normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También pueden usarse otros fosfolípidos u otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica y de la presencia de cationes divalentes.

Como alternativa, la molécula de ácido nucleico puede combinarse con otros transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables para producir una composición farmacéutica. Los transportadores y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. La composición puede formularse para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica.

Las vías de administración descritas pretenden únicamente ser una orientación dado que un experto en la materia podrá determinar fácilmente la vía de administración óptima y cualquier dosificación para cualquier animal o estado particular. Se han intentado estrategias múltiples para introducir material genético nuevo funcional en las células, tanto *in vitro* como *in vivo* (Friedmann 1989 (Science 244: 1275-1280)). Estas estrategias incluyen la integración del gen a expresar en los retrovirus modificados (Friedmann 1989, citado anteriormente; Rosenberg 1991 (Cancer Research 51(18), supl.: 5074S-5079S)); integración en vectores no retrovíricos (Rosenfeld *et al.* 1992 (Cell 68: 143-155); Rosenfeld *et al.* 1991 (Science 252: 431-434)); o la administración de un transgén ligado a un elemento potenciador promotor heterólogo mediante liposomas (Friedmann 1989, citado anteriormente; Brigham *et al.* 1989 (Am J Med Sci 298: 278-281); Nabel *et al.* 1990 (Science 249: 1285-1288); Hazinski *et al.* 1991 (Am J Resp Cell Molec Biol 4: 206-209); y Wang y Huang 1987 (Proc Natl Acad Sci USA, 84: 7851-7855)); acoplados a sistemas de transporte basados en cationes, específicos de ligando acoplados (Wu y Wu 1988 (J Biol Chem 263: 14621-14624)) o el uso de ADN desnudo, vectores de expresión (Nabel *et al.* 1990, citado anteriormente); Wolff *et al.* 1990 (Science 247: 1465-1468)). La inyección directa de transgenes en el tejido produce solo expresión localizada (Rosenfeld 1992, citado anteriormente; Rosenfeld *et al.* 1991, citado anteriormente; Brigham *et al.* 1989, citado anteriormente; Nabel 1990, citado anteriormente; y Hazinski *et al.* 1991, citado anteriormente). El grupo de Brigham *et al.* (Am J Med Sci 298: 278-281 (1989) y Clinical Research 39 (resumen) (1991)) han publicado la transfección *in vivo* únicamente de pulmones de ratones después de administración intravenosa o intratraqueal de un complejo de ADN-liposoma. Un ejemplo de un artículo de revista de procedimientos de terapia génica en seres humanos es: Anderson 1992 (Science 256: 808-813).

Las formulaciones farmacéuticas como se desvela en el presente documento, pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales muy conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas pueden incluir en general la etapa de asociar los principios activos con el transportador o transportadores farmacéuticos o excipiente o excipientes. En general las formulaciones se preparan asociando uniformemente y de modo íntimo los principios activos con transportadores líquidos o transportadores sólidos finamente divididos o ambas cosas, y después, si fuera necesario, dar forma al producto.

Las sustancias presentes activas pueden usarse en combinación o en solitario con cualquier otro ingrediente farmacéutica o biológicamente activo, particularmente que sea adecuado para el tratamiento de enfermedades como las que se indican en el presente documento ("terapia de combinación"). Las terapias de combinación contempladas en el presente documento pueden comprender la administración de al menos una sustancia activa de la presente memoria descriptiva y al menos otro principio farmacéutica o biológicamente activo. Dicha sustancia (o sustancias) presentes activas y dicho ingrediente (o ingredientes) farmacéutico o biológicamente activo puede administrarse en cualquiera de las mismas o diferentes formulaciones farmacéuticas, de manera simultánea o secuencial en cualquier

orden.

La dosificación o cantidad de las sustancias activas presentes usadas, opcionalmente en combinación con uno o más de otros compuestos activos a administrar, depende del caso individual y debe adaptarse normalmente a las circunstancias individuales para conseguir un efecto óptimo. Por tanto, depende de la naturaleza y de la gravedad del trastorno que se vaya a tratar y también del sexo, edad, peso corporal, salud general, dieta, modo y tiempo de administración y de la respuesta individual del ser humano o animal a tratar, sobre la vía de administración, eficacia, estabilidad metabólica y duración de la acción de los compuestos que se utilicen o si de la terapia es aguda o crónica o profiláctica, o de si se administran otros compuestos activos además del agente o los agentes de la memoria descriptiva.

Sin limitación, dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas sobre diversos días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosificación preferida de la sustancia activa de la memoria descriptiva puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. Por tanto, una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas) puede administrarse al paciente. Dichas dosis pueden administrarse intermitentemente, por ejemplo, cada semana, o cada dos o tres semanas.

En una realización, una composición farmacéutica puede comprender entre aproximadamente 10 nM y aproximadamente 1 µM, preferentemente entre aproximadamente 20 nM y aproximadamente 600 nM, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 100 nM o aproximadamente 200 nM, o aproximadamente 300 nM, o aproximadamente 400 nM o aproximadamente 500 nM de agente antisentido o agente ARNi como se explica en el presente documento.

Excepto cuando se indica, "sujeto" o "paciente" se usan indistintamente y se refieren a animales, preferentemente animales de sangre caliente, más preferentemente vertebrados, incluso más preferentemente mamíferos, incluso más preferentemente primates, y específicamente incluye pacientes humanos y mamíferos no humanos y primates. Los pacientes preferidos son sujetos humanos.

Como se usa en el presente documento, una frase tal como "un sujeto que necesite el tratamiento" incluye sujetos que se beneficiarían del tratamiento de una afección determinada, particularmente de la distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD) o un tumor, tal como preferentemente un sarcoma, tal como más preferentemente un sarcoma seleccionado de la familia de tumores de Ewing, sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados y rhabdomyosarcomas. Dichos sujetos pueden incluir, sin limitación, aquellos a los que se ha diagnosticado dicha afección, aquellos que están propensos a contraer o desarrollar dicha afección y/o aquellos en los que va a prevenirse dicha afección.

Los términos "tratar" o "tratamiento" incluyen tanto tratamiento terapéutico de una enfermedad ya desarrollada o afección, tal como la terapia de un FSHD o tumor ya desarrollado, tal como preferentemente un sarcoma, tal como más preferentemente un sarcoma seleccionado de los tumores de la familia de Ewing, sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados y rhabdomyosarcomas, así como mediciones profilácticas o preventivas, en el que el objetivo es prevenir o disminuir las probabilidades de la incidencia de la dolencia no deseada, tal como prevenir la probabilidad de contracción y progresión de FSHD o un tumor, tal como preferentemente un sarcoma, tal como más preferentemente un sarcoma seleccionado de la familia de tumores de Ewing, sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados y rhabdomyosarcomas. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados pueden incluir, sin limitación, el alivio de uno o más síntomas o de uno o más marcadores biológicos, la disminución del grado de la enfermedad, estabilizar (es decir no empeorar) la patología, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, la mejora o paliar la patología y similar. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto activo o agente farmacéutico que inhibe o retrasa en un sujeto la aparición de un trastorno que busca un investigador, un veterinario, médico u otro especialista clínico. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que suscita la respuesta biológica o medicinal en un sujeto que está buscando un investigador, veterinario, médico u otro especialista clínico, que puede incluir entre otras cosas el alivio de los síntomas de la enfermedad o afección que se esté tratando. En la técnica se conocen métodos para determinar dosis terapéutica y profilácticamente eficaces de los compuestos de la presente invención.

La referencia a "enfermedades o afecciones que comprenden niveles aumentados y/o actividad aumentada de la doble homeocaja 4 y/o doble homeocaja 4c" generalmente incluye enfermedades y afecciones en las que el nivel y/o actividad de DUX4 y/o DUX4c está aumentado en cualquier grado (medible) en comparación con un estado no patológico de referencia, tal como sin limitación aumentado en al menos aproximadamente 10 %, por ejemplo, en al

menos aproximadamente 20 %, preferentemente en al menos aproximadamente 30 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente 40 %, más preferentemente en al menos aproximadamente 50 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente 75 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente 100 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 % o en al menos aproximadamente 500 %, en comparación con un estado de no enfermedad de referencia. El término también incluye situaciones en las que un estado no enfermo de referencia comprende un nivel no demostrable y/o actividad de DUX4 y/o DUX4c mientras que un estado de enfermedad comprende algún nivel demostrable y/o actividad de DUX4 y/o DUX4c. El nivel y/o actividad de DUX4 y/o DUX4c puede aumentarse en cualquiera de las células, tejidos y/u órganos de un paciente, preferentemente en las células, tejidos y/u órganos relevantes para o verse afectado en una enfermedad o afección. Por ejemplo, el nivel y/o actividad de DUX4 y/o DUX4c puede aumentarse en células de músculo y tejidos de músculo, tales como, por ejemplo, en mioblastos y/o en miocitos, en músculos blandos y/o en músculos estriados tal como músculos esqueléticos o cardíacos, etc.

El nivel de DUX4 y/o DUX4c puede medirse en cualquiera de una o más fases, tal como la fase de pre-ARNm o ARNm (por ejemplo, mediante RT-PCR cualitativa o cuantitativa) y/o proteína (por ejemplo, métodos de inmunoensayo). La actividad de la proteína de DUX4 y/o DUX4c puede medirse mediante cualquier ensayo bioquímico o celular adecuado, por ejemplo, medir su potencial de transactivación sobre dianas conocidas.

La distrofia muscular facioescapulohumeral (FSHD, FSHMD o FSH) también conocida como distrofia muscular de Landouzy-Dejerine incluye todas las enfermedades y afecciones conocidas en estas designaciones en la técnica. Más particularmente, la FSHD como se pretende en el presente documento es un trastorno muscular dominante autosómico genéticamente ligado a contracciones de la matriz de repetición de D4Z4 sobre la región subtelomérica 4q35, más particularmente en la que los pacientes con FSHD tienen entre 1 y 10 copias de D4Z4, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 copias. También particularmente, la FSHD puede ligarse con el alelo 4qA, incluso más particularmente con los alelos permisivos 4A161, 4A161L, 4A159 o 4A168.

Además, aunque un pequeño grupo de pacientes con un fenotipo FSHD típico presente más de 10 copias del elemento D4Z4, estos pacientes muestran un nivel de metilación de ADN por debajo de lo normal a la repetición, similar al encontrado en las matrices D4Z4 contraídas. Por consecuencia, la FSHD puede concluirse generalmente cuando se observa hipometilación de ADN en la repetición D4Z4, independientemente del número de unidades D4Z4.

Las enfermedades o afecciones cuyo tratamiento puede beneficiarse de la reducción de la expresión de la doble homeocaja 4 y/o doble homeocaja 4c también incluyen específicamente aquellas que comprenden la expresión de fragmentos o variantes de DUX4 y/o DUX4c, más particularmente la expresión de proteínas de fusión entre DUX4 o DUX4c (preferentemente DUX4) y otras proteínas no relacionadas, más preferentemente, dichas proteínas de fusión que comprenden el fragmento C-terminal de DUX4 o DUX4c (preferentemente DUX4), incluso más preferentemente dichas proteínas de fusión con *CIC*, un homólogo humano de *Drosophila capicua*, o con *EWSR1*. Dichas proteínas de fusión se expresan normalmente como un resultado de reordenamientos cromosómicos y favorecen la proliferación celular y, por tanto, puede causar tumores, tales como en particular tumores de la familia de Ewing (EFT) (Kawamura-Saito *et al.* 2006, citado anteriormente) y sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados (Yoshimoto *et al.* 2009, citado anteriormente) y rhabdomiomas (Sirvent *et al.* 2009, citado anteriormente), respectivamente. Por tanto, dichos ARNm de fusión incluyen los elementos de secuencia de los genes *DUX4* o *DUX4c* (preferentemente el gen *DUX4*) a los que se dirigen agentes antisentido y/o agentes de ARNi como se describe en el presente documento, pudiendo reducir estas herramientas la expresión de dichas proteínas de fusión de forma similar a como reducen la expresión de la longitud completa de la proteína DUX4 o DUX4c. Por tanto, las enfermedades y afecciones que se pretenden en el presente documento también incluyen tumores, más particularmente sarcomas, incluso más particularmente los tipos de tumor anteriormente mencionados. Como se usa en el presente documento, el término "tumor" se refiere a una masa anómala de tejido que resulta de una división celular excesiva. Un tumor comprende "células tumorales" que son células neoplásicas con propiedades de crecimiento anómalas y que pueden también comprender "células no tumorales asociadas a tumor", por ejemplo, células vasculares que forman vasos sanguíneos para dar aporte al tumor. Un tumor puede ser benigno o maligno. El término "sarcoma" incluye tipos tumorales que implican células de tejido conectivo, tal como, por ejemplo, sin limitación, hueso, cartílago, adipocitos, músculos y vasos sanguíneos.

Los aspectos anteriores y realizaciones se ofrecen adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

Ejemplo 1: los oligonucleótidos antisentido dirigidos contra elementos de secuencia implicados en el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4* son muy eficaces en la regulación negativa de la expresión de la doble homeocaja 4.

Se diseñaron oligómeros antisentido (OA) basándose en la secuencia de la UTR 3' del gen *DUX4* (Figura 1). Los 7 OA incluyen uno (JSR 1521 pLAM2A) dirigido contra las posiciones -7+18 del límite intrón 1-exón 2 de *DUX4* (incluyendo el sitio aceptor de corte y empalme del intrón 1), y seis OA dirigidos contra el límite intrón 2-exón 3 de

*DUX4* (incluyendo el sitio aceptor del corte y empalme del intrón 2), indicado como JSR 1522 pLam3A (-7+18), JSR1523 pLam3A (-12+13), JSR1524 pLam3A (-2+23), JSR1696 pLam3A (-7+18), JSR1719 pLam3A (-12+18) y JSR1720 pLam3A (-17+13). Como control negativo se usó un OA que se dirige a distrofina.

5 OA anti-*DUX4*:

JSR 1521 pLam2A (-7+18): CUCUCACCGGGCCUAGACCUAGAAG (SEQ ID NO: 16)  
 JSR 1522 pLam3A (-7+18): UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCA (SEQ ID NO: 17)  
 JSR1523 pLam3A (-12+13): ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 18)  
 10 JSR1524 pLam3A (-2+23): CGGGGUGCGCACUGCGCGCAGGUCU (SEQ ID NO: 19)  
 JSR1696 pLam3A (-7+18): UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCA (SEQ ID NO: 17)  
 JSR1719 pLam3A (-12+18): UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 20)  
 JSR1720 pLam3A (-17+13): ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAGCGGGC (SEQ ID NO: 21)

15 OA que se dirigen a distrofina (controles negativos)

JSR 1662 mGMCSF3A (-05+20): UCCCACAGAAGCUAACAUGUGUGCAGAC

20 Todos los OA usados en este ejemplo tenían una estructura 2'-O-metil fosforotioato. Se usó OA que tenía estructura morfolino fosforodiamidato con resultados al menos comparables o superiores. Se usaron OA conjugados con un péptido penetrador de células (PPC) con resultados superiores o al menos comparables.

Ensayo de mioblastos de ratón C2C12 que expresan de manera transitoria *Dux4*

25 La eficacia de los oligonucleótidos antisentido (OA) contra el pre-ARNm de *DUX4* se evaluó en la expresión transitoria en mioblastos de ratón C2C12 cultivados *in vitro*. Estas células se transfectaron con el vector de expresión *pCIneo-DUX4* que contenía la región codificante *DUX4* del último elemento D4Z4 y la región *pLam* flanqueante bajo el fuerte promotor del CMV.

30 Se sembraron 10<sup>5</sup> mioblastos de ratón C2C12 por pocillo de placas de 6 pocillos y se cultivaron a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 % en DMEM, suero bovino fetal al 10 % oro (PAA), antibióticos al 1 % (penicilina, estreptomycin, fungizona). Se transfectaron 24 horas después con 500 ng por pocillo de vector de expresión *pCIneo-DUX4* en solitario o combinado con el OA indicado. El control negativo es OA 1662 que se dirige al ARNm de distrofina. El reactivo de transfección fue Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) usado a una proporción de 1 µg OA/reactivo 1 µl, y una  
 35 concentración de OA de 600 nM. Las células se lisaron 24 horas después de la transfección, y se prepararon extractos de proteína totales en tampón de muestra LDS NuPAGE® (Invitrogen). 15 µg de extractos de proteínas se separaron por electroforesis (SDS-PAGE al 12 %), y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El *DUX4* (52 kDa) se detectó en esta transferencia de Western con el anticuerpo monoclonal 9A12 seguido por anticuerpos IgG anti ratón acoplados a peroxidasa (HRP) y revelados con el kit Lumi-Light (Roche) detectado en una película.  
 40 Después de separar estos anticuerpos, se incubó la misma membrana con un anticuerpo anti actina para proporcionar un control de carga. El anticuerpo monoclonal de ratón (MAb 9A12) se indujo como se describe en Dixit *et al.* 2007 (anteriormente) dirigido contra la parte de carboxilo terminal de *DUX4*. Aunque este anticuerpo reacciona en cruzado con *DUX4c*, las dos proteínas pueden diferenciarse fácilmente en la transferencia de Western basándose en sus pesos moleculares aparentes diferentes, es decir 52 kDa para *DUX4* y 47 kDa para *DUX4c*

45 En la Figura 9 se muestran los resultados. No pudo detectarse ninguna proteína *DUX4* (flecha) por transferencia de Western usando el anticuerpo monoclonal 9A12 seguido de la adición de diferentes OA dirigidos contra pre-ARNm de *DUX4*. A diferencia de la proteína *DUX4* que se expresó claramente en el OA dirigido contra el pre-ARNm de distrofina o en ausencia de OA.

50 Ensayo de mioblastos de ratón C2C12 que expresan de manera transitoria *Dux4* o *Dux4c*

Otro experimento demuestra, usando la estrategia de expresión transitoria explicada anteriormente, que el OA 1524 puede conseguir regulación negativa específica de la expresión de *DUX4* sin afectar a la expresión de la proteína *DUX4c* (Figura 10). Células C2C12 se transfectaron con bien el vector de expresión *pCIneo-DUX4* o *pCIneo-DUX4c*,  
 55 en solitario o con diferentes concentraciones de OA 1524 que se dirige al ARNm *DUX4* o el OA 1662 control negativo (concentración de 600 nM). Las proteínas *DUX4* y *DUX4c* se detectaron en una transferencia de Western de extractos de proteína celular como se describe anteriormente. En este experimento, OA 100 nM (en recuadro en la Figura 10) sustancialmente suprimió la detección de la proteína *DUX4* en la transferencia de Western pero no afectó a los niveles de *DUX4c*, demostrando de este modo la especificidad del direccionamiento por este OA.  
 60

Ensayo de mioblastos de ratón C2C12 que expresan de manera transitoria *Dux4* y *Dux4c*

65 Se obtuvieron resultados similares en un experimento de cotransfección en células C2C12 usando los vectores de expresión *pCIneo DUX4* y *DUX4c*, de tal manera que ambos ARNm estaban presentes simultáneamente en las mismas células. Las células C2C12 se cotransfectaron con vectores de expresión *pCIneo-DUX4* y *pCIneo-DUX4c*,

con diferentes concentraciones de OA 1524 que se dirige al ARNm de *DUX4*, o el control negativo OA 1662 (600 nM). Las proteínas *DUX4* y *DUX4c* se detectaron en una transferencia de Western de extractos de proteína celular como se ha descrito anteriormente. En este experimento, OA 150 nM (Figura 11) suprimió sustancialmente la detección de la proteína *DUX4* en la transferencia de Western pero no afectó a los niveles de *DUX4c*, corroborando por lo tanto adicionalmente la especificidad del direccionamiento por este OA.

En estudios de cotransfección análogos usando el otro OA, también se demostró especificidad comparable para *DUX4* para OA 1522 y 1523 (usando OA 150 nM, véase la Figura 12) y OA 1521 (usando OA 50 nM, no mostrado). Además, concentraciones más bajas en este experimento consiguen especificidad comparable para OA1719 y 1720.

Ensayo de mioblastos primarios FSHD que expresan de manera endógena *DUX4*

Para ensayar la eficacia de los OA 1521 pLAM2A (-7+18) y 1523 pLAM3A (-12 + 13) sobre la expresión de *DUX4* endógena, se transfectaron mioblastos FSHD primarios con 1521 pLAM2A (-7+18) 50 nM o con 1523 pLAM3A (-12+13) 150 nM o con 600 nM del OA de control negativo (cn-OA; JSR 1662 mGMC3F3A (-5+20)). La diferenciación se indujo 4 horas después de la transfección y tres días después los miotubos se lisaron para la extracción de ARN total. Se realizó transcripción inversa (RT, *reverse transcription*) en 500 ng de ARN total de miotubo tratado con DNasa usando el kit FirstChoice®RLM-RACE (Ambion). Se amplificaron 5 µl del ADNc resultante por PCR anidada con cebadores que previamente se ha mostrado que son específicos de la UTR3' del ARNm de *DUX4* (Dixit *et al.* 2007., citado anteriormente). Se usó la amplificación de ARNm GAPDH como un control interno. Los productos RT-PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Se realizó una densitometría de las bandas para cuantificación. Los datos se normalizaron a niveles de ARNm GAPDH.

La Figura 29 muestra que el fragmento de ADN esperado de 550 pb se detectaba en miotubos FSHD tratados con cn-OA y a 30 % y 50 % de intensidad reducida en células tratadas con los OA 1521 pLAM2A(-7+18) (Figura 29a) o 1523 pLAM3A (-12+13) (Figura 29b), respectivamente. Este amplicón también se observó en el control positivo, es decir, células C2C12 transfectadas con pGEM42, pero no en los controles negativos, es decir, células C2C12 transfectadas con el vector pGEM vacío, o mioblastos primarios de un donante sano, o después de la omisión de la transcriptasa inversa. Los productos RT-PCR se clonaron y se secuenciaron para confirmar la amplificación del ARNm de *DUX4* (datos no mostrados).

Ejemplo 2: el ARNic (ARN de interferencia corto) dirigido contra la región UTR3' del ARNm de *DUX4* o *DUX4c* consigue silenciamiento específico de la expresión de *DUX4* o *DUX4c*

Se desarrollaron agentes de ARNic anti *DUX4* basándose en y que comprendían las siguientes secuencias de ARNm de *DUX4*

ARNic-DUX41: acaccuggcuggcuacgga (SEQ ID NO: 47)

ARNic-DUX42: ggucuaggcccgugagag (SEQ ID NO: 48)

ARNic-DUX43: ccuggauuagaguacauc (SEQ ID NO: 49).

Se desarrollaron agentes de ARNic anti-*DUX4c* basándose en las siguientes secuencias de ARNm *DUX4c*:

ARNic-DUX4c1: ccagaguucagcaaaagg (SEQ ID NO: 56);

ARNic-DUX4c2: ggagggcugucuucuuuc (SEQ ID NO: 57);

ARNic-DUX4c3: gcuuucucagucgaguug (SEQ ID NO: 58).

Las células se transfectaron usando el "Kit Iniciador Silenciador de ARNic" (Ambion) que contenía el agente de transfección Si-PORT™ NeoFX™ (Ambion). Se usaron células TE671 (células procedentes de un rhabdomyosarcoma alveolar humano) para las transfecciones, usando el método "inverso" recomendado por el proveedor, en el que el reactivo de transfección se introduce en la placa de cultivo antes de sembrar las células. Este método fue tres veces superior al método tradicional en nuestras manos. Las condiciones de transfección se optimizaron usando ARNic anti-GAPDH control suministrado con el kit anterior. Las condiciones optimizadas incluían 2 µl de reactivo SiPORT™ NeoFX™, ARNic 10 nM y una densidad de  $5 \times 10^4$  células/ml.

Ensayo de una línea celular TE671 con un transgén *DUX4c* inducible

La eficiencia del ARNic dirigido contra el ARNm *DUX4c* se ensayó usando líneas TE671-*DUX4c* previamente establecidas. Estas células tenían incorporado el vector de expresión *pAC1M2-DUX4c* en el que la transcripción *DUX4c* es inducible por doxiciclina (DOX).

En primer lugar las células se transfectaron usando las condiciones anteriores, que conducen a solo una ligera inhibición de DUX4c. Por lo tanto, la concentración de ARNic se aumentó a 20 nM que no era tóxico para las células.

Las células se sembraron a una densidad de  $1 \times 10^5$  células/pocillo de una placa de cultivo de 6 pocillos y se transfectaron con ARNic-DUX4c1 20 nM ("ic") mediante el método de transfección inversa (Ambion). 4 horas después de la transfección, la expresión de DUX4c se indujo ("I") añadiendo 1 mg/ml de doxociclina en el medio de cultivo. El tercer o quinto día después de la inducción, las células se lisaron y se analizaron 20 µg de extractos de proteínas por electroforesis SDS-PAGE (10 %), y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con suero de conejo anti-DUX4c dirigido contra un péptido en el dominio carboxiterminal seguido por un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa y revelado con el kit de Lite-ABlot® (Euroclone). También se analizó la expresión de la proteína DUX4c (tinción nuclear) por inmunohistoquímica en células TE-DUX4c transfectadas con ARNic-DUX4c1. Las células se transfectaron y la expresión de DUX4c se indujo como se ha explicado anteriormente. El tercer o quinto día después de la inducción, las células se fijaron en PAF y se incubaron con suero de conejo anti-DUX4c y anticuerpos secundarios acoplados a un colorante rojo (Alexa Fluor®). Las fotografías se tomaron con un microscopio de fluorescencia después de seleccionar un campo en el que muchas células eran visibles con la luz blanca.

Después de tres días, pudo observarse una disminución significativa de la cantidad de proteína DUX4c en extractos de células tratadas con ARNic 1 en comparación con las células no tratadas así como por transferencia de Western (Figura 13A) como por inmunofluorescencia (no mostrada). Después de cinco días, la expresión de DUX4c aumentó de nuevo en las células transfectadas (Figura 13A), lo que podría explicarse por una posible degradación o dilución del ARNic con respecto al tiempo. Se habían obtenido datos similares usando ARNic-DUX4c 2 ("ic2") o 3 ("ic3") en comparación con un ARNic de control negativo ("icCN") al 3er día después de la inducción de la expresión de DUX4c (Figura 13B).

#### Ensayo de una línea celular TE671 que expresa de manera transitoria DUX4c

Para confirmar los resultados obtenidos sobre la línea TE671-DUX4c estable, se repitió el experimento sobre células TE671. Se transfectaron células con el ARNic y cuatro horas después con el vector de expresión *pCIneo-DUX4c* que contenía el fuerte promotor/potenciador de citomegalovirus.

Las células se transfectaron con ARNic-DUX4c 20 nM ("ic1", "ic2" y "ic3") o con ARNic de control negativo ("icCN") usando transfección inversa (Ambion) y 4 horas después con el vector *pCIneo-DUX4c* (DUX4c). Se prepararon extractos de proteína y se fijaron células el tercer día después de la transfección del vector *pCIneo-DUX4c*. Las metodologías para la transferencia de Western e inmunofluorescencia fueron como se ha expuesto anteriormente.

Una inhibición de la expresión de DUX4c similar al experimento previo se observó por transferencia de Western (Figura 14) e inmunofluorescencia (no mostrado). Se seleccionó el ARNic 1 como el más eficaz.

#### Ensayo de una línea celular TE671 que expresa de manera transitoria DUX4

Usando metodología similar como en la sección anterior (excepto que el gel es un SDS-PAGE al 12 %, el anticuerpo primario es el anticuerpo monoclonal 9A12), se transfectaron primero células TE671 usando el método de transfección inversa con cada uno de los tres ARNic contra DUX4. Cuatro horas más tarde, se transfectaron estas células con el vector de expresión *pCIneo-DUX4*. Tres días después de la segunda transfección, la expresión de DUX4 desapareció por completo en células tratadas con ARNic así como en transferencia de Western (Figura 15) como en inmunofluorescencia (no mostrado). Se seleccionó el ARNic 3 para estudios adicionales ya que se dirige a región particularmente específica de DUX4.

#### Especificidad de los ARNic seleccionados

Se transfectaron células TE671 con ARNic-DUX4c ("icDUX4c") o ARNic-DUX4 ("icDUX4") (20 nM) usando la transfección inversa y 4 horas después con el vector de expresión *pCIneo-DUX4* ("DUX4") o *pCIneo-DUX4c* ("DUX4c"). Los extractos de proteína se prepararon el tercer día después de la transfección con los vectores *pCIneo* y se revelaron por transferencia de Western con el anticuerpo monoclonal 9A12 y anticuerpos secundarios acoplados a HRP. Después los anticuerpos se separaron, y se desarrolló la misma membrana con un suero anti-actina (control interno).

La especificidad del ARNic se confirmó por la desaparición, en la transferencia de Western, de bandas correspondientes al peso molecular de DUX4 o DUX4c seguido de la adición de su ARNic respectivo y no con el ARNic de su homólogo (Figura 16).

#### Construcción de vectores de ARNhc (ARN de horquilla corto)

Para ensayar el efecto del ARNic sobre miotubos FSHD, se usaron vectores lentivirales para producir los ARNhc que se procesan en la célula para producir los ARNic idénticos a los que se seleccionaron (Figura 17). Previamente

se había demostrado que los mioblastos y miotubos podían transducirse eficazmente por dichos vectores. Para esto, ADN sintético correspondiente a las secuencias del ARNhc seleccionado (secuencia en sentido + bucle (CTCGAG) + secuencia antisentido) se insertaron en un vector de expresión que contenía el promotor del gen de histona H1. Por tanto, la unidad de transcripción contiene los siguientes elementos: promotor H1 --- CCGG (cadena sentido) bucle (cadena antisentido) TTTTT ---. La transcripción produce ARNhc que se procesa en ARNhc por Dicer (véase la Figura 18). El gen de ARNhc-H1 se subclonó en un vector pLVTH que contenía todos los elementos necesarios para la encapsidación.

Antes de la encapsidación, se comprobó la eficacia de los vectores pLVTH-ARNhc por transferencia de Western en células TE671 cotransfectadas con estos vectores y con el vector de expresión *pCIneo-DUX4* o *DUX4c*.

La Figura 19 muestra análisis de transferencia de Western de la expresión de la proteína DUX4 sobre extractos de células TE671 transfectadas con el vector de expresión *pCIneo-DUX4* ("TE + DUX4") o con ARNhc-DUX4 ("TE DUX4 + hcDUX4") o ARNhc-DUX4c ("TE DUX4 + hcDUX4c") (Fugene 6, Roche Molecular Biochemical). 48 horas después de la transfección, las proteínas se extrajeron y se analizaron 20 µg de estos extractos por electroforesis SDS-PAGE (12 %), después se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con MAb 9A12 seguido por anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa y se reveló con el kit LiteABlot® (Euroclone). Después los anticuerpos se separaron, y la misma membrana se reveló con un suero anti actina (control interno). Se realizó análisis de inmunofluorescencia de la expresión de la proteína DUX4c (tinción nuclear) en células TE671 transfectadas solo con el vector *pCIneo-DUX4c* o con ARNhc-DUX4 o ARNhc-DUX4c (Fugene 6). 48 horas después de la transfección, las células se fijaron en PAF al 4 % y se incubaron con anti-DUX4c y un anticuerpo secundario acoplado a un colorante rojo (Alexa Fluor®) (no mostrado).

Una disminución en la intensidad de la banda correspondiente a DUX4 52 kDa (Figura 19) y de la señal DUX4c en inmunofluorescencia (no mostrada) se confirmó después de la adición de su respectivo ARNhc.

Una vez demostrada su eficacia, se encapsidaron los vectores pLVTH-ARNhc. Después, se cotransdujeron mioblastos de control inmortales con lentivirus recombinantes que expresaban cualquiera de DUX4 o DUX4c y lentivirus recombinantes que expresaban su ARNhc respectivo. 72 horas después de la transducción, se detectaron por inmunofluorescencia las proteínas DUX4 y DUX4c usando el anticuerpo monoclonal 9A12. La presencia de ARNhc en las células se confirmó por la expresión de GFP codificado por el vector ARNhc.

Después de 72 horas, una expresión disminuida de ambas proteínas después de la adición de sus respectivos ARNhc fue visible por inmunofluorescencia (no mostrado).

#### Ensayo de mioblastos primarios FSHD que expresan de manera endógena *DUX4*

Mioblastos primarios FSHD humanos, que son difíciles de transfectar, se transfectaron después del método de transfección inversa como se describe anteriormente usando el "Kit Iniciador de ARNhc Silenciador" (Ambion). Las condiciones de transfección óptimas, que definen un reactivo de transfección eficaz con baja citotoxicidad para mioblastos primarios humanos, se configuraron usando ARNhc anti-GAPDH control con el kit anterior. 72 horas después de la transfección, las células se recogieron y se separaron 10 µg de extractos de proteína mediante SDS-PAGE (12 %) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia de la proteína se confirmó por tinción de la membrana con rojo amapola. Después de aclarar la membrana, esta se incubó con anticuerpo monoclonal anti-GAPDH, seguido por un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante y revelado con el sustrato Lumilight (Roche) seguido por detección sobre una película fotográfica. Las condiciones de transfección óptimas incluyeron 4 µl de reactivo SIPORT™ NeoFX™, ARNhc 20 nM, y una densidad celular de 10<sup>5</sup> células en una placa de cultivo de 35 mm (Figura 22).

Para ensayar la eficacia del ARNhc dirigido contra el ARNm *DUX4*, se transfectaron mioblastos primarios FSHD con el ARNhc usando las condiciones de transfección especificadas anteriormente.

Las células se sembraron a una densidad de 10<sup>5</sup> células en una placa de cultivo de 35 mm y se transfectaron con ARNhc de control o con DUX4-ARNhc3 siguiendo el método de transfección inversa usando 4 µl de reactivo SIPORT™ NeoFX™. Se ensayaron 3 concentraciones diferentes de DUX4-ARNhc3 (10 nM, 20 nM y 30 nM) para determinar la mejor concentración para su uso para reducir la expresión de DUX4 endógeno. Dado que la proteína DUX4 solo era detectable en miotubos, 4 horas después de la transfección, la diferenciación de mioblastos se indujo reemplazando el medio de cultivo por un medio sin suero. Las células se recogieron 72 h después de la diferenciación y se realizaron extractos de proteína nuclear. 20 µg de estos extractos de proteína nuclear y 5 µg de extracto de proteína nuclear de células TE671 que se transfectaron con el vector de expresión *pCIneo-DUX4* (TE-DUX4), que se usó como un control positivo, se separaron por SDS-PAGE (12 %) y se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa. La transferencia de la proteína se confirmó por tinción de la membrana con rojo amapola (no mostrado). Después de aclarar la membrana, se incubó con el anticuerpo monoclonal 9A12 seguido por un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante y se reveló con el kit Femto Super Signal (Pierce) seguido por la detección sobre una película fotográfica. Los anticuerpos se separaron después y la misma membrana se inmunotizó con un anticuerpo monoclonal TBP como un control de carga nuclear.

Después de tres días, una disminución significativa de la cantidad de proteína DUX4, como se indica mediante una flecha roja, podía observarse en extractos de proteínas de células tratadas con DUX4-ARNic en comparación con células tratadas con el ARNic control mediante transferencia de Western (Figura 23).

5 La eficacia del ARNic que se dirigen a ARNm de *DUX4* se confirmó mediante RT-PCR como una disminución del ARNm de *DUX4* endógeno en miotubos primarios de FSHD. Mioblastos primarios de FSHD se transfectaron con DUX4-ARNic 10 nM 3 o ARNic control (30 nM) usando las condiciones de transfección especificadas anteriormente. 4 horas después de la transfección, la diferenciación de mioblastos se indujo como se ha especificado anteriormente. Después de una diferenciación durante 3 días, se extrajo ARN total de los miotubos. Se realizó transcripción inversa (RT) en 500 ng de ARN total de miotubo tratado con DNasa usando el kit FirstChoice®RLM-RACE (Ambion). Se amplificaron 5 µl del ADNc resultante por PCR anidada con cebadores que previamente se había demostrado que eran específicos de la UTR3' del ARNm de *DUX4* (Dixit *et al.* 2007, citado anteriormente). Se usó amplificación con ARNm GAPDH como un control interno. Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %. Se realizó una densitometría de las bandas para la cuantificación. Los datos se normalizaron con niveles de ARNm de GAPDH.

Como se muestra en la Figura 30, el fragmento de ADN esperado de 550 pb se detectó en miotubos FSHD transfectados con el ARNic control (cn-ARNic) y a una intensidad del 80 % reducida en las células tratadas con DUX4-ARNic 3. Este amplicón también se ha observado en el control positivo es decir células C2C12 transfectadas con el vector pGEM42 que contenía dos unidades D4Z4 (Gabriëls *et al.* 1999, citado anteriormente) pero no en mioblastos primarios de un donante sano (Cont) o después de la omisión de transcriptasa inversa. Los productos de RT-PCR se clonaron y se secuenciaron para confirmar la amplificación del ARNm de *DUX4* (datos no mostrados).

Ejemplo 3: oligonucleótidos antisentido adicionales dirigidos contra el pre-ARNm de *DUX4*

25 Se diseñaron dos oligómeros antisentido (OA) adicionales dirigidos contra el pre-ARNm de *DUX4* basándose en la secuencia génica de *DUX4*. Uno de estos OA, el JSR 2245 pLAM poliA (-13+6), es capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del ARNm de *DUX4*. El otro OA, el JSR 2250 pLAM1D (+7 -18 que rodea el límite exón-1 intrón-1), es capaz de unirse a un elemento de secuencia localizado en la secuencia no traducida 3' del ARNm de *DUX4* entre el codón de terminación y el primer intrón (véase la Figura 31). Aunque el JSR 2250 pLAM1D se une a un límite exón-intrón, en un experimento inicial no parece interferir con el corte y empalme de *DUX4*.

35 JSR 2245 pLAM poliA (-13+6): GGGCAUUUUAAUAUAUCUCUGAACU (SEQ ID NO: 65)  
JSR 2250 pLAM1D (+7-18): ACCCGACCCCGUCCCAACCCGCGU (SEQ ID NO: 64)

Ambos OA tenían una estructura 2'-O-metil-fosforotioato.

40 La eficacia de ambos OA, JSR 2245 y JSR 2250, se evaluó en expresión transitoria en mioblastos de ratón C2C12 cultivados *in vitro* que se cotransfectaron con vectores de expresión *pCIneo* tanto *DUX4* como *DUX4c*, de tal manera que ambos ARNm estaban presentes simultáneamente en las mismas células.

45 Se sembraron 10<sup>5</sup> mioblastos de ratón C2C12 por pocillo de placas de 6 pocillos y se cultivaron a 37 °C y con CO<sub>2</sub> al 5 % en DMEM, oro de suero bovino fetal al 10 % (PAA), antibióticos al 1 % (penicilina, estreptomycin, fungizona). Se cotransfectaron 24 horas después con 500 ng por pocillo de los vectores de expresión *pCIneo-DUX4* y *pCIneo-DUX4c* combinados con el OA indicado. Dado que la concentración de 150 nM parecía ser la más efectiva en experimentos previos (véase el Ejemplo 1), se sometió a ensayo el efecto de los OA 2245 y 2250 que se dirigen al ARNm de *DUX4* usando esta concentración. El control negativo fue el OA 1662 que se dirige al ARNm de la distrofina y se usó a una concentración de 600 nM. El reactivo de transfección fue Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) usado a una proporción de 1 µg de OA/1 µl de reactivo. Las células se lisaron 24 horas después de la transfección, y se prepararon extractos de proteína total en un tampón de muestra NuPAGE® LSD (Invitrogen). 15 µg de extractos de proteínas se separaron por electroforesis (SDS-PAGE 12 %), y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. *DUX4* (52 kDa) se detectó en esta transferencia de Western con el anticuerpo monoclonal 9A12 seguido por anticuerpos de IgG anti ratón acoplados a peroxidasa (HRP) y se revelaron con el kit Lumi-Light (Roche) detectado en una película. Después de separar estos anticuerpos, se incubó la misma membrana con un anticuerpo anti-actina para proporcionar un control de carga.

60 Los resultados se muestran en la Figura 32. En las condiciones especificadas anteriormente, el OA 2250 podría reducir fuertemente los niveles de *DUX4* en comparación con el control OA 1662 negativo mientras que *DUX4c* aún se expresaba. Por otro lado OA 2245 suprimió las proteínas tanto *DUX4* como *DUX4c* en esta concentración, lo que sugiere que incluso concentraciones más bajas pueden ser necesarias para usar en caso de que se pretenda direccionamiento específico de la producción de *DUX4* (Figura 32).

65 En un experimento similar, se usó el OA 2245 a una concentración de 10, 25, 50, 100 o 150 nM. Se encontró que la concentración óptima para inhibir específicamente la expresión de la proteína *DUX4* era de 50 nM (Figura 33).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Université de Mons

5 <120> AGENTES ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE LA DISTROFIA MUSCULAR FACIOESCAPULOHUMERAL

<130> UMH-008-EP

10 <150> 10175125.3  
<151> 02-09-2010

<160> 69

15 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1  
<211> 1080  
<212> ADN  
20 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

```

    agaaacggag gccccggggg agctggaggc ctcggaagag gccgcctcgc tggaaagcacc      60
    cctcagcagag gaagaatacc gggctctgct ggaggagctt taggacgcgg ggttgggacg      120
    gggtcgggtg gttcggggca gggccgtggc ctctctttcg cggggaacac ctggctggct      180
    acggaggggc gtgtctccgc cccgccccct ccaccgggct gaccggcctg ggattcctgc      240
    cttctaggte taggcccggg gagagactcc acaccgcgga gaactgccat tctttcctgg      300
    gcatcccggg gatcccagag ccggcccagg tacctgcgca cgcgcggggt tgcgggcagc      360
    cgctgggct gtgggagcag cccgggcaga gctctctgce ctctccacca gcccaacccg      420
    ccgcctgacc gccccctccc cccccccac cccccacccc cggaaaacgc gtcgtccccct      480
    gggctgggtg gagacccccg tccgcgaaa caccgggccc cgcgcagcgt ccgggctga      540
    ctccgctccg gcggctcgcc tctgtgtgce ccccgogcca ccgtcgcccg cccgcccggg      600
    cccctgcage ctcccagctg ccagcgcgga gctcctggcg gtcaaaagca tacctctgtc      660
    tgtctttgcc cgcttctctg ctagacctgc gogcagtgcg caccccggct gacgtgcaag      720
    ggagctcgtt ggcctctctg tgcctttggt cttecgtaaa attctggctg aatgtctccc      780
    cccaccttcc gacgctgtct aggcaaacct ggattagagt tacatctcct ggatgattag      840
    ttcagagata tattaaaatg cccctcctct gtggatccta tagaagattt gcatcttttg      900
    tgtgatgagt gcagagatat gtcacaatat cccctgtaga aaaagcctga aattggttta      960
    cataacttcc gtgatcagtg cagatgtggt tcagaactcc atagtagact gaacctagag     1020
    aatggttaca tcacttaggt gatcagtgta gagatatggt aaaattctcg tgtagacaga     1080
  
```

25 <210> 2  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

# ES 2 596 977 T3

<400> 2  
 ggctctgctg gaggagcttt aggacgcggg gttgggacgg ggtcgggtgg ttcggggcag 60

5 <210> 3  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3  
 gaggagcttt aggacgcggg gttgggacgg ggtcgggtgg 40

15 <210> 4  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 4  
 gctgaccggc ctgggattcc tgccttctag gtctaggccc ggtgagagac tccacaccgc 60

25 <210> 5  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 5  
 ctgggattcc tgccttctag gtctaggccc ggtgagagac 40

35 <210> 6  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 6  
 ggcatcccgg ggatcccaga gccggcccag gtacctgcgc acgcgcgggt ttgccccag 60

45 <210> 7  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 7  
 ggatcccaga gccggcccag gtacctgcgc acgcgcgggt 40

55 <210> 8  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 8  
 tctgtctgtc ttgcccgt tctggctag acctgcgcgc agtgcgcacc ccggctgacg 60

65 <210> 9  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

70 <400> 9  
 ttgcccgt tctggctag acctgcgcgc agtgcgcacc 40

75 <210> 10  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

80 <400> 10  
 cttctaggtc taggcccgt gagag 25

# ES 2 596 977 T3

<210> 11  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
  
 <400> 11  
 tggctagacc tgcgcgagc gcgca 25  
 10  
 <210> 12  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 12  
 cttcctggct agacctgcbc gcagt 25  
  
 <210> 13  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 20  
  
 <400> 13  
 agacctgcbc gcagtgcgca ccccg 25  
 25  
 <210> 14  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
 <400> 14  
 cttcctggct agacctgcbc gcagtgcgca 30  
  
 <210> 15  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
  
 <400> 15  
 gcccgcctcc tggctagacc tgcgcgagc 30  
 40  
  
 <210> 16  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 45  
  
 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4  
 50  
 <400> 16  
 cucucaccgg gccuagaccu agaag 25  
  
 <210> 17  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 55  
  
 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4  
 60  
 <400> 17  
 ugcgcacugc gcgcaggucu agcca 25  
  
 <210> 18  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 65

ES 2 596 977 T3

<213> Artificial  
 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4  
 5  
 <400> 18  
 acugcgcgca ggucuagcca ggaag 25  
 <210> 19  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10  
 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4  
 15  
 <400> 19  
 cggggugcgc acugcgcgca ggucu 25  
 <210> 20  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4  
 25  
 <400> 20  
 ugcgcacugc gcgcaggucu agccaggaag 30  
 <210> 21  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4  
 35  
 <400> 21  
 acugcgcgca ggucuagcca ggaagcgggc 30  
 <210> 22  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 22  
 acctccccac agcccacagc tctgtcata gtgcgggaat agtgttctat cactacagga 60  
 <210> 23  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 23  
 agcccacagc tctgtcata gtgcgggaat agtgttctat 40  
 <210> 24  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 60  
 <400> 24  
 gcagagagga aagcggctct cgcctccag ggccagcggg acctgcact cgggaaaac 60  
 65  
 <210> 25

ES 2 596 977 T3

<211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5      <400> 25  
 aagcggctct ccgcctccag ggccagcggg acctcgact    40

<210> 26  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 26  
 gtcaccagc cctccggatc gccggcccgg gtcacttcat cccggagcaa ttcggacgaa    60

15

<210> 27  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 27  
 cctccggatc gccggcccgg gtcacttcat cccggagcaa    40

25

<210> 28  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 28  
 cgggtccac gtccttcgc cctctgcaag gggacctgtt gctcgcgtgt ctcccgcgcc    60

35

<210> 29  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29  
 gtccttcgc cctctgcaag gggacctgtt gctcgcgtgt    40

40

<210> 30  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

45

<400> 30  
 ttgaggaaa caggaatccg tggcaggcc gtgatgcacc cgacgttct tttctctgca    60

50

<210> 31  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31  
 caggaatccg tggcaggcc gtgatgcacc cgacgttct    40

55

<210> 32  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

60

<400> 32  
 agtcaagaca gcggctcca gttccatag aattactgga gaacctcaga gagccagccc    60

65

<210> 33  
 <211> 40  
 <212> ADN

ES 2 596 977 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 33  
gcggctcca gttccatag aattactgga gaacctcaga 40

5

<210> 34  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 34  
gaagaacacc gggctctgct ggaggagcag gttggagcgg ggtggggcg ggtgggggc 60

15

<210> 35  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 35  
gggctctgct ggaggagcag gttggagcgg ggtggggcg 40

25

<210> 36  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 36  
ctggattcca cgtttcttg ccctctgcag aggtgcctgt tgctcaagtc tctgccccg 60

35

<210> 37  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 37  
cgtttcttg ccctctgcag aggtgcctgt tgctcaagtc 40

45

<210> 38  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 38  
ttccaggaat gcgtggaaca ccagcatcgt gtcggtgctc tcctttccag ttcaaacag 60

55

<210> 39  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

60

<400> 39  
gcgtggaaca ccagcatcgt gtcggtgctc tcctttccag 40

65

<210> 40  
<211> 60  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

70

<400> 40  
ctgtcctctt ggtgctggtg gtctgaaag ttgtcgagtg cgccgctccc tgtggtggga 60

75

<210> 41  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

ES 2 596 977 T3

<400> 41  
ggtgctgtgg gtcctgaaag ttgtcgagtg cgcccgtccc 40

5 <210> 42  
<211> 1990  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 42

```
ccaccccccc cccccaccac caccaccacc accaccccgc cggccggccc caggcctcga 60
cgccctgggt cccttccggg gtggggcggg ctgtcccagg ggggctcacc gccattcatg 120
aaggggtgga gcctgcctgc ctgtgggcct ttacaagggc ggctggctgg ctggetgget 180
gtccgggcag gectcctgge tgcacctgcc gcagtgcaca gtccggetga ggtgcacggg 240
agcccgcggg cctctctctg cccgcgtccg tccgtgaaat tccggccggg gctcaccgcg 300
atggccctcc cgacaccctc ggacagcacc ctccccgcgg aagcccgggg acgaggacgg 360
cgacggagac tcgtttggac cccgagccaa agcgaggccc tgcgagcctg ctttgagcgg 420
```

ES 2 596 977 T3

aaccggtacc cgggcatcgc caccagagaa oggctggccc aggccatcgg cattccggag 480  
cccaggggtcc agatttggtt tcagaatgag aggtcacgcc agctgaggca gcaccggcgg 540  
gaatctcggc cctggcccgg gagacggggc ccgccagaag gccggcgaaa gcggaccgcc 600  
gtcaccggat cccagaccgc cctgctcctc cgagcctttg agaaggatcg ctttccaggc 660  
atcgccgcc cggaggagct ggccagagag acgggcctcc cggagtccag gattcagatc 720  
tggtttcaga atcgaagggc caggcacccg ggacaggggtg gcagggcgcc cgcgcaggca 780  
ggcggcctgt gcagcggggc ccccgggggg ggtcacctctg ctccctcgtg ggtcgccttc 840  
gccacaccg gcgcgtgggg aacggggctt cccgcacccc acgtgccctg cgcgcctggg 900  
gctctccac agggggcttt cgtgagccag gcagcgaggg ccgccccgc gctgcagccc 960  
agccaggccg cgcggcaga gggggctctc caacctgcc cggcgcgcg ggatttcgcc 1020  
tacgcgcc cggctcctcc ggacggggcg ctctcccacc ctcaaggctcc tcgggtggcct 1080  
ccgcaccgg gcaaaagccg ggaggacogg gaaccgcage gcgacggcct gccgggcccc 1140  
tgcgcgggtg cacagcctgg gcccgctcaa ggggggcgc agggccaagg ggtgcttgcg 1200  
ccaccacgt cccaggggag tccgtggtgg ggctggggcc ggggtcccca ggtcgccggg 1260  
gcggcgtggg aacccaagc cggggcagct ccacctccc agcccgcgcc cccggacgcc 1320  
tccgcctccg cgcggcaggg gcagatgcaa ggcacccgg cgcctccca ggcgctccag 1380  
gagccggcgc cctggtctgc actcccctgc ggctgctgc tggatgagct cctggcgagc 1440  
ccggagtttc tgcagcagge gcaacctctc ctagaaacgg agggcccggg ggagctggag 1500  
gcctcggaag aggcgcctc gctggaagca cccctcagcg aggaagaata ccgggctctg 1560  
ctggaggagc ttaggacgc ggggttgga cggggtcggg tggttcgggg cagggccctg 1620  
gcctctctt cgcggggaac acctggctgg ctacggaggg gcgtgtctcc gccccgccc 1680  
ctccaccgg ctgaccggcc tggattcct gccttctagg tctaggccc gtgagagact 1740  
ccacaccgg gagaaactgc attcttctc gggcatcccg gggatcccag agccggccca 1800  
gacctgcgcg cagtgcgcac cccggctgac gtgcaagggg gctcgtggc ctctctgtgc 1860  
ccttgttctt ccgtgaaatt ctggctgaat gtctccccc accttcgac gctgtctagg 1920  
caaacctgga ttagagttac atctcctgga tgattagttc agagatatat taaaatgcc 1980  
cctccctgtg 1990

<210> 43  
<211> 1854  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

ccaccccccc cccccaccac caccaccacc accaccccgc eggccggccc caggcctega 60  
 cgccctgggt cccttccggg gtggggcggg ctgtcccagg ggggctcacc gccattcatg 120  
 aaggggtgga gcctgcctgc ctgtgggcct ttacaagggc ggctggctgg ctggctggct 180  
 gtccgggcag gcctcctggc tgcacctgcc gcagtgcaca gtccggctga ggtgcacggg 240  
 agcccggcgg cctctctctg cccgcgtccg tccgtgaaat tccggccggg gctcacccgc 300  
 atggccctcc cgacaccctc ggacagcacc ctccccgcgg aagcccgggg acgaggacgg 360  
 cgacggagac tcgtttggac cccgagccaa agcgaggccc tgcgagcctg ctttgagcgg 420  
 aacccgtaac cgggcatcgc caccagagaa cggctggccc aggccatcgg cattccggag 480  
 cccagggtcc agatttggtt tcagaatgag aggtcacgcc agctgaggca gcaccggcgg 540  
 gaatctcggc cctggcccgg gagacgcggc ccgccagaag gccggcgaaa gcggaccgcc 600  
 gtcaccggat cccagaccgc cctgctcctc cgagcctttg agaaggatcg ctttccaggc 660  
 atcgccgcc gggaggagct ggccagagag acgggcctcc cggagtccag gattcagatc 720  
 tggtttcaga atcgaagggc caggcaccgc ggacagggtg gcagggcgcc cgcgcaggca 780  
 ggcggcctgt gcagcgcggc ccccgcgggg ggtcaccctg ctccctcgtg ggtcgccttc 840  
 gccacacccg gcgcgtgggg aacggggctt cccgcacccc acgtgccttg cgcgcctggg 900  
 gctctcccac agggggcttt cgtgagccag gcagcgaggg ccgccccgc gctgcagccc 960  
 agccaggccg cgcgggcaga gggggtctcc caacctgccc cggcgcgcgg ggatttcgcc 1020  
 tacgccgcc cggctcctcc ggacggggcg ctctcccacc ctccaggctcc tcgggtggcct 1080  
 ccgcacccgg gcaaaagccg ggaggaccgg gaccgcagc gcgacggcct gccgggcccc 1140  
 tgcgcgggtg cacagcctgg gcccgctcaa gcggggccgc agggccaagg ggtgcttgcg 1200  
 ccacccaagt cccaggggag tccgtggtgg ggctggggcc ggggtcccca ggtcgcgggg 1260  
 gcggcgtggg aaccccaagc cggggcagct ccacctcccc agcccgcgcc cccggacgcc 1320  
 tcgcctccg cgcggcaggg gcagatgcaa ggcattcccg cgccctccca ggcgctccag 1380  
 gagccggcgc cctggtctgc actcccctgc ggctgctgc tggatgagct cctggcgagc 1440  
 ccggagtttc tgcagcaggc gcaacctctc ctagaaacgg aggccccggg ggagctggag 1500  
 gcctcggaag aggcgcctc gctggaagca cccctcagcg aggaagaata cgggctctg 1560  
 ctggaggagc tttaggacgc ggggtctagg cccggtgaga gactccacac cgcggagaac 1620  
 tgccattctt tcctgggcat cccggggatc ccagagccgg ccagacctg cgcgcagtgc 1680  
 gcaccccggc tgacgtgcaa gggagctcgc tggcctctct gtgcccttgt tcttccgtga 1740  
 aattctggct gaatgtctcc ccccacctc cgacgctgtc taggcaaacc tggattagag 1800  
 ttacatctcc tggatgatta gttcagagat atattaaaat gccccctccc tgtg 1854

<210> 44  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5

<400> 44  
 cgcggggaac accuggcugg cuacggaggg gcgug 35

10  
 <210> 45  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

15  
 <400> 45  
 gccuucuagg ucuaggcccg gugagagacu ccaca 35

20  
 <210> 46  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

25  
 <400> 46  
 uaggcaaacc uggauuagag uuacaucucc uggau 35

30  
 <210> 47  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Agente de ARN de interferencia de DUX4

35  
 <400> 47  
 acaccuggcu ggcucgga 19

40  
 <210> 48  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Agente de ARN de interferencia de DUX4

45  
 <400> 48  
 ggucuaggcc cggugagag 19

50  
 <210> 49  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Agente de ARN de interferencia de DUX4

55  
 <400> 49  
 ccuggauuag aguuacauc 19

60  
 <210> 50  
 <211> 1714  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

65  
 <400> 50

ES 2 596 977 T3

ggagggcggg ctaccccggg accttgggccc ccgagctcat gcatgttcat aacgcgggtg 60  
 aggtggtagg tctttctaag ggctcctggt ctgcacctgc cgcagtgcac aggccggctg 120  
 aggtgcacgg gagcccggcg gcctctctct gcccggtcc gtccgtgaaa tccgggccgg 180  
 ggctcaccgc gatggcctc ccgacacctt cggacagcac cctccccggc gaagcccggg 240  
 gacgaggacg gcgacggaga ctcgtttggg ccccagagcca aagcgaggcc ctgcgagcct 300  
 gctttgagcg gaacccgtac ccgggcatcg ccaccagaga acggctggcc caggccatcg 360  
 gcattccgga gccacgggtc cagatttggg ttcagaatga gaggtcacgc cagctgaggc 420  
 agcacggcg ggaatctcgg ccctggcccg ggagacggcg cccgccagaa ggccggcgaa 480  
 agcggaccgc cgtcacggga tcccagaccg ccctgctcct ccgagccttt gagaaggatc 540  
 gctttccagg catcgccgcc cgggaggagc tggccagaga gacgggcctc ccggagtcca 600  
 ggattcagat ctggtttcag aatcgaaggg ccaggcaccg gggacagggg ggacggggcg 660  
 ccgcgacggc aggcggcctg tgcagcggcg ccccggcggg gggtcaccct gctccctcgt 720  
 gggtcgcctt cgcaccacacc ggcgcggtgg gaacggggct tcccgacacc cacgtgcctt 780  
 gcgcgcttg ggctctccca cagggggctt tcgtgagcca ggcagcgagg gccgcccccg 840  
 cgtgcagcc cagccaggcc gcgcggcag aggggatctc ccaacctgcc ccggcgcgcg 900  
 gggatttcgc ctacgccgcc ccggctcctc cggacggggc gctctcccac cctcaggctc 960  
 ctcggtgccc tccgcacccg ggcaaaaagc gggaggaccg ggacccgcag cgcgacggcc 1020  
 tgccggggcc ctgcgcgggtg gcacagcctg ggcccgtca agcggggccg cagggccaag 1080  
 gggtgcttgc gccaccccacg tcccagggga gtccgtggtg gggctggggc cggggtcccc 1140  
 aggtcgcggg ggcgcggtgg gaaccccgaag ccggggcagc tccacctccc cagcccgcgc 1200  
 ccccggacgc ctccgggca agcacagatg ccagccatcc aggcgctcc caaccgctcc 1260  
 aggagccggg gcgctcgtct acagtcacct ccagcctgtt atatgagctc ctgtagacac 1320  
 cagagtttca gcaaaaaggca cgaccttcc tagatccggc gccactgggg gagctgaagg 1380  
 acgtggaaga gcccgctctg ctggaaccac tctcagcca ggaagaacac cgggctctgc 1440  
 tgaggagca ggttgagcg gggttggggc ggggtggggg caggacggcg cctctctttt 1500  
 cgcgggtaac ctctgactcg gtatggagag gcgtgccttc ccttccagct gacctgteta 1560  
 ggatccctga gttccaggtc cgggtgagaga ctccacacag aggagggctg tcattctttc 1620  
 ctgagcatcc cggggatccc agggcccggc caggtaccgg gaggtggact gtctactgcg 1680  
 catgcgacgg tttgcaggca gcagcctagg tttt 1714

<210> 51  
 <211> 1903

ES 2 596 977 T3

<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 51

5

**ggagggcggg ctaccocggg accttgggcc ccgagctcat gcatgttcat aacgcggtgg 60**

ES 2 596 977 T3

aggtggtagg tctttctaag ggectcctgg ctgcacctgc cgcagtgcac aggccggctg 120  
 aggtgcacgg gagcccggcg gcctctctct gcccgcgtcc gtccgtgaaa ttccggccgg 180  
 ggctcaccgc gatggccctc ccgacacctt cggacagcac cctccccgcg gaagcccggg 240  
 gacgaggacg gcgacggaga ctcgtttggg ccccgagcca aagcgaggcc ctgogagcct 300  
 gctttgagcg gaaccctgtac ccgggcatcg ccaccagaga acggctggcc caggccatcg 360  
 gcattccgga gcccagggtc cagatttggg ttcagaatga gaggtcacgc cagctgaggc 420  
 agcaccggcg ggaatctcgg ccctggcccg ggagacggcg cccgccagaa ggccggcgaa 480  
 agcggaccgc cgtcaccgga tcccagaccg ccctgctcct ccgagccttt gagaaggatc 540  
 gctttccagg catcgccgcc cgggaggagc tggccagaga gacgggctc cccggagtcca 600  
 ggattcagat ctggtttcag aatcgaaggg ccaggcaccg gggacagggt ggcagggcgc 660  
 ccgcgacaggc agggggcctg tgcagcggcg cccccggcg gggtcaccct gctccctcgt 720  
 gggtegcctt cgcaccacc ggcgcgtagg gaacggggct tcccgcacc cactgcct 780  
 gcgcgcctgg ggtctccca cagggggctt tcgtgagcca ggcagcgagg gccgcccccg 840  
 cgctgcagcc cagccaggcc gcgcggcag aggggatctc ccaacctgcc ccggcgcgcg 900  
 gggatttcgc ctacgcgcc ccggctcctc cggacggggc gctctcccac cctcagctc 960  
 ctcggtggcc tccgcaccg ggcaaaagcc gggaggaccg ggaccgcag cgcgacggcc 1020  
 tgccgggccc ctgcgcggtg gcacagcctg ggcccgtca agcggggccg cagggccaag 1080  
 gggtgcttgc gccaccacg tcccagggga gtccgtggtg gggctggggc cggggteccc 1140  
 aggtcgccgg ggcggcgtgg gaaccccaag cccgggcagc tccacctccc cagcccgcgc 1200  
 ccccggaagc ctccgcggca agcacagatg ccagccatcc aggcgcctcc caaccgctcc 1260  
 aggagccggg gcgctcgtct acagtcacct ccagcctgtt atatgagctc ctgtagacac 1320  
 cagagtttca gcaaaaggca cgaccttcc tagatccggc gccactgggg gagctgaagg 1380  
 acgtggaaga gcccgctctg ctggaaccac tcctcagcca ggaagaacac cgggctctgc 1440  
 tggaggagca ggttgagcg gggttggggc ggggtggggg caggacggcg ccctctcttt 1500  
 cgcggtgaac ctctgactcg gtatggagag gcgtgccttc ccttcagct gacctgtcta 1560  
 ggatccctga gttccaggtc cggtgagaga ctccacacag aggagggctg tcattctttc 1620  
 ctgagcatcc cggggatecc agggcccgc caggtaccgg gaggtggact gtctactgcg 1680  
 catgcgcagg tttgcaggca gcagcctagg tttccaacc agcccaggcg gagctctcat 1740  
 tcctttttcc ccagcgttct tcagtcagat tggcggagac ctcagtcgcg gaagcgtgg 1800  
 gccggggcag aagccaggcc agttctcctt tccgtggctc gactcctctg cctcttcgct 1860  
 caccaact tgccaacccc cgtcccgcc gctcctcgc cag 1903

<210> 52  
<211> 2409  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 52

ES 2 596 977 T3

atgtettatc gtcacttccg tgtcatccta tccctgacct cccacagcc cacagctctt 60  
 gtcataggcc agcgggacct cgcactccgg gaaaacgtgg ggtgcccggg gcaggccgag 120  
 agctcggccc acagcccggt ctgettgcgg ggcgcccacc agctcaccag cctccggat 180  
 cgcgggcccg ggggacctgt tgctcgcgtg tctccgccc cggaaagcgc gaccacgttg 240  
 gctgtttccc gagctctgcg gggacacaga aacctccagc gaagcgtgga aaagcagcat 300  
 cgtgacttcg ctctccttc cggtttcag accggccaca gtggagactc ccttgttg 360  
 aggaaacagg aatccgtggt caggccaatt actggagaac ctgagagagc cagccccgga 420  
 agccccctt tccccctcaa tccggcctg caccaccca cccacaagg cctgggtccc 480  
 tgtggttttc ggcttcggag ggogggctac cccgggacct tgggccccga gctcatgcat 540  
 gttcataacg cggtagggt ggtaggtctt tctaagggcc tectggctgc acctgccga 600  
 gtgcacaggc cggctgaggt gcacgggagc ccgcccgtct ctctctgccc gcgtccgtcc 660  
 gtgaaattcc ggccggggct caccgcatg gccctcccga caccctcggg cagcaccctc 720  
 cccgcggaag cccggggacg aggacggcga cggagactcg tttggacccc gagccaaagc 780  
 gaggccctgc gagcctgctt tgagcggaac ccgtaccggg gcatcgccac cagagaacgg 840  
 ctggcccagg ccatcggcat tccggagccc agggtcaga tttggtttca gaatgagagg 900  
 tcacgccagc tgaggcagca ccggcgggaa tctcgccct ggcccgggag acgcccggc 960  
 ccagaaggcc ggcgaaagcg gaccgcccgc accggatccc agaccgccc gctcctccga 1020  
 gcctttgaga aggatcgtt tccaggcatc gccgcccggg aggagctggc cagagagacg 1080  
 ggcctcccgg agtccaggat tcagatctgg tttcagaatc gaaggccag gcacccggga 1140  
 cagggtggca gggcggcccgc gcaggcaggc ggctgtgca gcgcccggc tggcgggggt 1200  
 caccctgctc cctcgtgggt cgccttcgce cacaccggcg cgtggggaac ggggcttccc 1260  
 gcacccccag tgcctgccc gcctggggct etcccacagg gggtttcgt gagccaggca 1320  
 gcgagggccc cccccgcgt gcagcccagc caggccgccc cggcagaggg ggtctccaa 1380  
 cctgcccggg cgcgcgggga tttcgctac gccgcccggg ctctccgga cggggcgtc 1440  
 tcccaccctc aggetcctc gtggcctccg caccgggca aaagccggga ggaccgggac 1500  
 gcgcagcgcg acggcctgcc gggcccctgc gcggtggcac agcctgggccc cgtcaagcg 1560  
 gggccgcagg gccaaagggt gcttgcgcca cccacgtccc aggggagtcc gtggtggggc 1620  
 tggggccggg gtccccaggc cgcggggcg gcgtgggaa cccaagccgg ggcagctcca 1680  
 cctccccagc ccgcgcccc ggacgcccgc gcggcaagca cagatgccag ccatccaggc 1740  
 gcctcccaac cgtccagga gccggggcgc tcgtctacag tcacctccag cctgttatat 1800

ES 2 596 977 T3

gagctcctgt agacaccaga gtttcagcaa aaggcacgac ctttcctaga tccggcgcca 1860  
 ctgggggagc tgaaggacgt ggaagagccc gctctgctgg aaccactcct cagccaggaa 1920  
 gaacaccggg ctctgctgga ggagcagagg tgctgttgcc tcaagtctct gcccccgccc 1980  
 cccgaaagtg tgaccatggt gactgtttgt ttcccagact ctgtggggac ccagaaactt 2040  
 ccaggaatgc gtggaacacc agcatcgttt gtcgagtgcg cccgtccctg tgggtgggagc 2100  
 agtggccccg agcgtgcccc cgggccccgg cttgggttcc tctcgtgttt agaatggtat 2160  
 ggccgtagac aatggcggtg ggcctggctt ggtccaagag cccggtccag ctacgcgcgt 2220  
 ctgattccag gcgtcaccac caaccggggg ccgcgaggct gggatcaggc acccccggag 2280  
 ccgctcgcgc gcggccgggc tgctctcccc ctctatacgc ccaagcacca gtcgcccgcgc 2340  
 tgcgttttcc gccggcctcg cagagcgtcc cgtatcgcgc ggcggccaga ccacgcgcag 2400  
 gaccgctga 2409

5 <210> 53  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 53  
 uguagacacc agaguucag caaaaggcac gaccu 35

15 <210> 54  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54  
 cacacagagg agggcuguca uucuuuccug agcau 35

20 <210> 55  
 <211> 35  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 55  
 uuuccccagc guucuucagu cgaguuggcg gagac 35

30 <210> 56  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Agente de ARN de interferencia de DUX4c

35 <400> 56  
 ccagaguuc agcaaaagg 19

40 <210> 57  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Agente de ARN de interferencia de DUX4c

ES 2 596 977 T3

5 <400> 57  
 ggagggcugu cauucuuuc 19  
 <210> 58  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 10 <220>  
 <223> Agente de ARN de interferencia de DUX4c

15 <400> 58  
 gcuuucuca gucgaguug 19  
 <210> 59  
 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 20 <400> 59

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



ES 2 596 977 T3

Ser Gln Ala Leu Gln Glu Pro Ala Pro Trp Ser Ala Leu Pro Cys Gly  
 420 425 430

Leu Leu Leu Asp Glu Leu Leu Ala Ser Pro Glu Phe Leu Gln Gln Ala  
 435 440 445

Gln Pro Leu Leu Glu Thr Glu Ala Pro Gly Glu Leu Glu Ala Ser Glu  
 450 455 460

Glu Ala Ala Ser Leu Glu Ala Pro Leu Ser Glu Glu Glu Tyr Arg Ala  
 465 470 475 480

Leu Leu Glu Glu Leu  
 485

<210> 60  
 <211> 374  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 60

Met Ala Leu Pro Thr Pro Ser Asp Ser Thr Leu Pro Ala Glu Ala Arg  
 1 5 10 15

Gly Arg Gly Arg Arg Arg Arg Leu Val Trp Thr Pro Ser Gln Ser Glu  
 20 25 30

Ala Leu Arg Ala Cys Phe Glu Arg Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Ala Thr  
 35 40 45

Arg Glu Arg Leu Ala Gln Ala Ile Gly Ile Pro Glu Pro Arg Val Gln  
 50 55 60

Ile Trp Phe Gln Asn Glu Arg Ser Arg Gln Leu Arg Gln His Arg Arg  
 65 70 75 80

Glu Ser Arg Pro Trp Pro Gly Arg Arg Gly Pro Pro Glu Gly Arg Arg  
 85 90 95

Lys Arg Thr Ala Val Thr Gly Ser Gln Thr Ala Leu Leu Leu Arg Ala  
 100 105 110

Phe Glu Lys Asp Arg Phe Pro Gly Ile Ala Ala Arg Glu Glu Leu Ala  
 115 120 125

Arg Glu Thr Gly Leu Pro Glu Ser Arg Ile Gln Ile Trp Phe Gln Asn  
 130 135 140

10

ES 2 596 977 T3

Arg Arg Ala Arg His Pro Gly Gln Gly Gly Arg Ala Pro Ala Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Gly Gly Leu Cys Ser Ala Ala Pro Gly Gly Gly His Pro Ala Pro Ser  
 165 170 175  
 Trp Val Ala Phe Ala His Thr Gly Ala Trp Gly Thr Gly Leu Pro Ala  
 180 185 190  
 Pro His Val Pro Cys Ala Pro Gly Ala Leu Pro Gln Gly Ala Phe Val  
 195 200 205  
 Ser Gln Ala Ala Arg Ala Ala Pro Ala Leu Gln Pro Ser Gln Ala Ala  
 210 215 220  
 Pro Ala Glu Gly Ile Ser Gln Pro Ala Pro Ala Arg Gly Asp Phe Ala  
 225 230 235 240  
 Tyr Ala Ala Pro Ala Pro Pro Asp Gly Ala Leu Ser His Pro Gln Ala  
 245 250 255  
 Pro Arg Trp Pro Pro His Pro Gly Lys Ser Arg Glu Asp Arg Asp Pro  
 260 265 270  
 Gln Arg Asp Gly Leu Pro Gly Pro Cys Ala Val Ala Gln Pro Gly Pro  
 275 280 285  
 Ala Gln Ala Gly Pro Gln Gly Gln Gly Val Leu Ala Pro Pro Thr Ser  
 290 295 300  
 Gln Gly Ser Pro Trp Trp Gly Trp Gly Arg Gly Pro Gln Val Ala Gly  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Trp Glu Pro Gln Ala Gly Ala Ala Pro Pro Pro Gln Pro Ala  
 325 330 335  
 Pro Pro Asp Ala Ser Ala Ala Ser Thr Asp Ala Ser His Pro Gly Ala  
 340 345 350  
 Ser Gln Pro Leu Gln Glu Pro Gly Arg Ser Ser Thr Val Thr Ser Ser  
 355 360 365  
 Leu Leu Tyr Glu Leu Leu  
 370

<210> 61  
 <211> 1800

<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 61

5

ctctgctgga ggagctttag gacgcgggggt tgggacgggg tcgggtggtt cggggcaggg 60  
 ccgtggcctc tctttcgcgg ggaacacctg gctggctacg gaggggctg tctccgcccc 120  
 gccccctcca ccgggctgac cggcctggga ttectgcctt ctaggcttag gcccggtgag 180  
 agaactcaca ccgcgagaaa ctgccattct ttctgggca tcccgggat cccagagccg 240  
 gccaggtac cagcaggtgg gccgcctact gcgcacgcgc gggtttgccg gcagccgct 300  
 gggctgtggg agcagcccgg gcagagctct cctgcctctc caccagecca ccccgcgcc 360  
 tgaccgcccc ctccccacce cccaccccc acccccgaa aacgcgtcgt ccctgggct 420  
 ggggtggagac ccccgctccg cgaaacaccg ggccccgcgc agcgtccggg cctgacaccg 480  
 ctccggcggc tcgctccta tgcgccccg cgcaccgctc gcccgccgc ccgggcccct 540  
 gcagccgccc aggtgccagc acggagcgc ttggggcgga acgcagacc caggcccggc 600  
 gcacaccggg gacgctgagc gttccaggcg ggagggaagg cgggcagaga tggagagagg 660  
 aacgggagac ctagaggggc ggaaggacgg gcggaggac gttaggaggg agggagggag 720  
 gcagggaggc agggaggaac ggagggaaag acagagcgc gcagggactg ggggcgggcg 780  
 ggagggagcc ggggaacggg gggaggaagg cagggaggaa aagcggctct cggcctccgg 840  
 gagtgcggg accccgccc tccggaaaa cggtcagcgt ccggcgcggg ctgagggctg 900  
 ggcccacagc cgcgcgccc gccggcgggg caccaccat tcgcccgggt tccgtggccc 960  
 agggagtggg cggtttctc cgggacaaa gaccgggact cgggttgccg tcgggtcttc 1020  
 acccgcgcgg ttcacagacc gcacatcccc aggetgagcc ctgcaacgcg gcgcgaggcc 1080  
 gacagccccg gccacggagg agccacacgc aggacgacgg aggcgtgatt ttggtttccg 1140  
 cgtggetttg ccctccgaa ggcggcctgt tgctcacgct tctccggccc ccgaaaggct 1200  
 ggccatgccg actgtttgct cccggagctc tgccggcacc cggaaacatg cagggaaggg 1260  
 tgcaagcccc gcacggtgcc ttgctctcc ttgccagggt ccaaaccggc cacactgcag 1320  
 actccccacg ttgccgcag cgggaatcca tcgtcaggcc atcacgcgg ggaggcatct 1380  
 cctctctggg gtctcgtct ggtcttctac gtggaaatga acgagagcca cacgcctgcg 1440  
 tgtgcgagac cgtcccggca acggcgacgc ccacaggcat tgctccttc acggagagag 1500  
 ggctggcac actcaagact cccacggagg ttcagttcca cactcccctc caccctccca 1560  
 ggtggtttc tcctgctgc cgacgcgtgg gagcccagag agcggcttcc cgttcccgcg 1620  
 ggatccctgg agaggtccgg agagccggcc cccgaaacgc gccccctcc ccctcccc 1680  
 ctctccccct tctcttctgt ctctccggcc ccaccaccac caccgccacc acgcctccc 1740  
 ccccccccc cccccccac caccaccacc accaccgcgc cggccggccc caggcctcga 1800

ES 2 596 977 T3

<210> 62  
 <211> 1229  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 62

```

ctctgctgga ggagctttag gacgcggggt tgggacgggg tcgggtggtt cggggcaggg      60
ccgtggcctc tcttctcgcg ggaacacctg gctggctacg gaggggcgtg tctccgcccc      120
gccccctcca ccgggctgac cggcctggga ttctctgcctt ctaggtctag gcccggtgag      180
agactccaca ccgcggagaa ctgccattct ttctctgggca tcccggggat cccagagccg      240
gccaggttac ctgcgcacgc gcggggttgc gggcagccgc ctgggctgtg ggagcagccc      300
gggcagagct ctctgcctc tccaccagcc caccocgccc cctgaccgcc ccctccccac      360
ccccaccccc ccacccccgg aaaacgcgtc gtcccctggg ctgggtggag acccccgtcc      420
cgcgaaacac cgggccccgc gcagcgtccg ggctgactc cgctccggcg gctcgcctcc      480
tgtgtgcccc cgcgccaccg tcgcccgccc gcccgggccc ctgcagcctc ccagctgcca      540
gcgcggagct cctggcggtc aaaagcatac ctctgtctgt ctttgccegc ttctctggta      600
gacctgcgcg cagtgcgcac cccggctgac gtgcaagggg gctcgtctgg ctctctgtgc      660
ccttgttctt ccgtgaaatt ctggctgaat gtctcccccc accttcggac gctgtctagg      720
caaacctgga ttagagttac atctcctgga tgattagttc agagatatat taaaatgccc      780
cctccctgtg gatcctatag aagatttgca tcttttgtgt gatgagtgca gagatatgtc      840
acaatatccc ctgtagaaaa agcctgaaat tggtttacat aacttcgggtg atcagtgcag      900
atgtgtttca gaactccata gtagactgaa cctagagaat ggttacatca cttaggtgat      960
cagtgtagag atatgttaaa attctcgtgt agacagagcc tagacaattg ttacatcacc     1020
tagtgatcag tgcagggata agtcataaag cctcctgtag gcagagtgta ggcaagtgtt     1080
ccctccctgg gctgatcagt gcagagatat ctcaaaagc ccctataagc caaaccttga     1140
caagggttac atcacctgtt tgagcagtggt aaatatatat cacaaagccc cctgtagaca     1200
aagcccagac aatttttaca tctcctgag                                         1229
    
```

10 <210> 63  
 <211> 1246  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 63

ES 2 596 977 T3

ctctgctgga ggagcttttag gacgcgggggt tgggacgggg tcgggtggtt cggggcaggg 60  
 ccgtggcctc tctttcgcg ggaacacctg gctggctacg gaggggctg tctccgcccc 120  
 gccccctcca ccgggctgac cggcctggga ttectgcctt ctaggcttag gcccggtgag 180  
 agactccaca ccgcggagaa ctgccattct ttctctgggca tcccggggat cccagagccg 240  
 gccaggtac cagcaggtgg gccgcctact gcgcacgcgc gggtttgcg gcagccgect 300  
 gggctgtggg agcagccccg gcagagctct cctgcctctc caccagccca ccccgcgcce 360  
 tgaccgcccc ctccccacc ccacccccca cccccgaaa acgcgtcgtc ccctgggctg 420  
  
 ggtggagacc cccgtcccgc gaaacaccgg gccccgcgca gcgtccgggc ctgacaccgc 480  
 tccggcggtt cgcctcctct gcgccccgc gccaccgtcg cccgccegc cgggcccctg 540  
 cagcctccca gctgccagcg cggagctcct ggcggtcaaa agcatacctc tgtctgtctt 600  
 tgcccgcttc ctggctagac ctgcgcgcag tgcgcacccc ggctgacgtg caaggagct 660  
 cgctggcctc tctgtgccct tgttcttcog tgaattctg gctgaatgc tccccacc 720  
 ttccgacgct gtctaggcaa acctggatta gagttacatc tcctggatga ttagttcaga 780  
 gatataataa aatgccccct ccctgtggat cctatagaag atttgcctct tttgtgtgat 840  
 gagtgcagag atatgtcaca atatccccct tagaaaaagc ctgaaattgg ttacataac 900  
 ttcgggtgatc agtgcagatg tgtttcagaa ctccatagta gactgaacct agagaatggt 960  
 tacatcactt aggtgatcag ttagagata tgttaaaatt ctctgttaga cagagcctag 1020  
 acaattgta catcacctag tgatcagtgc agggataagt cataaagcct cctgtaggca 1080  
 gagtgtaggc aagtgttccc tcctgggct gatcagtgca gagatatctc acaaagcccc 1140  
 tataagccaa accttgacaa gggttacatc acctgttga gcagtggaaa tataatcac 1200  
 aaagccccct gtagacaaag cccagacaat ttttacatct cctgag 1246

5 <210> 64  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4

<400> 64  
 acccgacccc gucccaaccc cgcgu 25

15 <210> 65  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Agente antisentido DUX4

# ES 2 596 977 T3

<400> 65  
gggcacuuuuu auauaucucu gaacu 25

5 <210> 66  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 66  
acgcgggggt gggacggggt cgggt 25

15 <210> 67  
<211> 66  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 67  
acatctcctg gatgattagt tcagagatat attaaaatgc cccctccctg tggatcctat 60  
agaaga 66

25 <210> 68  
<211> 46  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 68  
gatgattagt tcagagatat attaaaatgc cccctccctg tggatc 46

35 <210> 69  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 69  
agttcagaga tatattaaaa tgccc 25

**REIVINDICACIONES**

1. Un agente antisentido capaz de unirse al pre-ARNm de la doble homeocaja 4 (*DUX4*) o al pre-ARNm de la doble homeocaja 4c (*DUX4c*), en el que el agente antisentido es capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4* o *DUX4c* o es capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* o *DUX4c*, y en el que el agente antisentido es un oligonucleótido antisentido o análogo de oligonucleótido antisentido, para su uso como un medicamento.
2. El agente antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4* pero no del pre-ARNm de *DUX4c*, o capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* pero no del pre-ARNm de *DUX4c*.
3. El agente antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4c* pero no del pre-ARNm de *DUX4*, o capaz de unirse a un elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4c* pero no del pre-ARNm de *DUX4*.
4. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que:
- el agente antisentido tiene una longitud entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 nucleótidos o análogos de nucleótido, preferentemente una longitud entre aproximadamente 12 y aproximadamente 80 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 50, más preferentemente entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 o entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 nucleótidos o análogos de nucleótido; y/o
  - el agente antisentido es un oligonucleótido de 2'-O-metil fosforotioato o más preferentemente un oligonucleótido de morfolino fosforodiamidato; y/o
  - el agente antisentido está conjugado con un péptido penetrador de células (PPC).
5. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el elemento de secuencia necesario para el corte y empalme del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c* se selecciona del grupo que comprende sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme, segmentos ricos en pirimidina o polipirimidina aguas arriba de sitios aceptores de corte y empalme, límites exón-intrón, límites intrón-exón, sitios de ramificación y elementos potenciadores de corte y empalme exónico del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c*, preferentemente seleccionados del grupo que comprende sitios donantes de corte y empalme, sitios aceptores de corte y empalme, límites exón-intrón y límites intrón-exón del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c*.
6. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 5 configurado para unirse a al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente a al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente a al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente a al menos aproximadamente 25 bases o a al menos aproximadamente 30 bases, tal como, a entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o a entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de una cualquiera de las siguientes secuencias de pre-ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8) o variantes de las mismas, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 %, y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas:
- ggctctgctggaggagcttaggacgcggggtgggacggggtcgggtggttcggggcag (SEQ ID NO: 2);  
 gctgaccggcctgggattctgcttctaggtctaggcccggtagagactccacaccgc (SEQ ID NO: 4);  
 ggcatccgggatccagagccggcccaggtacctgcgcacgcgggttgcgggcag (SEQ ID NO: 6);  
 tctgtctgttctggcccgtcttggttagacctgcgcgcagtgcgacccccggctgacg (SEQ ID NO: 8).
7. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 a 6 que comprende una secuencia complementaria a una cualquiera de las siguientes secuencias de pre-ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 10 a 15, 66) o a variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o a fragmentos de las mismas que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de las secuencias o variantes respectivas:
- cttctaggtctaggcccggtagag (SEQ ID NO: 10);  
 tggctagacctgcgcgcagtgcgca (SEQ ID NO: 11);  
 cttcctggctagacctgcgcgcag (SEQ ID NO: 12);  
 agacctgcgcgcagtgcgacccccg (SEQ ID NO: 13);  
 cttcctggctagacctgcgcgcagtgcgca (SEQ ID NO: 14);

gcccccttctggttagacctgcgcgag (SEQ ID NO: 15);  
 acgcggggtgggacggggtcggt (SEQ ID NO: 66).

8. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4 a 7 que comprende una cualquiera de las secuencias (SEQ ID NO: 16 a 21, 64) o variantes de las mismas que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con las secuencias respectivas, o con fragmentos de las mismas que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas, de las secuencias o variantes respectivas:

CUCUCACCGGGCCUAGACCUAGAAG (SEQ ID NO: 16);  
 UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCA (SEQ ID NO: 17);  
 ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 18);  
 CGGGGUGCGCACUGCGCGCAGGUCU (SEQ ID NO: 19);  
 UGCGCACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAG (SEQ ID NO: 20);  
 ACUGCGCGCAGGUCUAGCCAGGAAGCGGGC (SEQ ID NO: 21);  
 ACCCGACCCCGUCCAACCCCGCGU (SEQ ID NO: 64).

9. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el elemento de secuencia necesario para la poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c* es una señal de poliadenilación del pre-ARNm de *DUX4* o de *DUX4c*.

10. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 9 configurado para unirse a al menos aproximadamente 10 bases, preferentemente a al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente a al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente a al menos aproximadamente 25 bases o a al menos aproximadamente 30 bases, tal como a entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 bases o a entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de la siguiente secuencia de pre-ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 67) o a variantes de la misma, que tienen una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia:

acatctctggtgattagttcagagatatataaaatgccccctcctgtggatcctatagaaga (SEQ ID NO: 67)

11. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4, 9 o 10 que comprende una secuencia complementaria a la siguiente secuencia de pre-ARNm de *DUX4* (SEQ ID NO: 69) o a variantes de la misma, que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia, o a fragmentos de la misma que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de dichas secuencias o variantes:

agttcagagatatataaaatgccc (SEQ ID NO: 69).

12. El agente antisentido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 o 9 a 11 que comprende la secuencia (SEQ ID NO: 65) o variantes de la misma que tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente 80 % y preferentemente de al menos aproximadamente 90 % o de al menos aproximadamente 95 % con dicha secuencia, o fragmentos de la misma que comprenden al menos 10 bases, o al menos 12 bases, preferentemente al menos aproximadamente 15 bases, más preferentemente al menos aproximadamente 20 bases, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 25 bases, preferentemente en el que dicha referencia a bases representa bases consecutivas de dichas secuencias o de variantes:

GGGCAUUUUAAUAUAUCUCUGAACU (SEQ ID NO: 65).

13. Un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más agentes antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o una construcción o un vector de ácido nucleico recombinante, preferentemente una construcción o un vector de expresión, que comprende un ácido nucleico que codifica uno cualquiera o más agentes antisentido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso como un medicamento.

14. Una célula hospedadora que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 13 o la construcción o el vector tal como se define en la reivindicación 13 para su uso como un medicamento.

- 5 15. Un organismo hospedador no humano que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 13 o la construcción o el vector tal como se define en la reivindicación 13 o la célula hospedadora tal como se define en la reivindicación 14.
- 10 16. Una composición o formulación que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 o el ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 13 o la construcción o el vector tal como se define en la reivindicación 13 o la célula hospedadora tal como se define en la reivindicación 14, preferentemente en el que la composición o la formulación es una composición farmacéutica que comprende adicionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, para su uso como un medicamento.
- 15 17. Una composición o formulación farmacéutica que comprende uno cualquiera o más agentes antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o el ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 13 o la construcción o el vector tal como se define en la reivindicación 13 o la célula hospedadora tal como se define en la reivindicación 14, y que comprende adicionalmente uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 20 18. Kit de componentes que comprende la composición o formulación farmacéutica tal como se define en la reivindicación 17.
- 25 19. Uno cualquiera o más agentes antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o el ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 13 o la construcción o el vector tal como se define en la reivindicación 13 o la célula hospedadora tal como se define en la reivindicación 14, o la composición o formulación tal como se define en la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento de la distrofia facioescapulohumeral (FSHD) o para el uso en el tratamiento de un sarcoma que comprende la expresión de una proteína de fusión entre DUX4 o DUX4c y otra proteína, no relacionada.
- 30 20. Uno cualquiera o más agentes antisentido tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, o un ácido nucleico tal como se define en la reivindicación 13 o una construcción o un vector tal como se define en la reivindicación 13 o célula hospedadora tal como se define en la reivindicación 14, o la composición o formulación tal como se define en la reivindicación 16 para su uso en el tratamiento de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el sarcoma se selecciona de la familia de tumores de Ewing, sarcomas infantiles de tejidos blandos indiferenciados y rabdomyosarcomas.

FIGURA 1

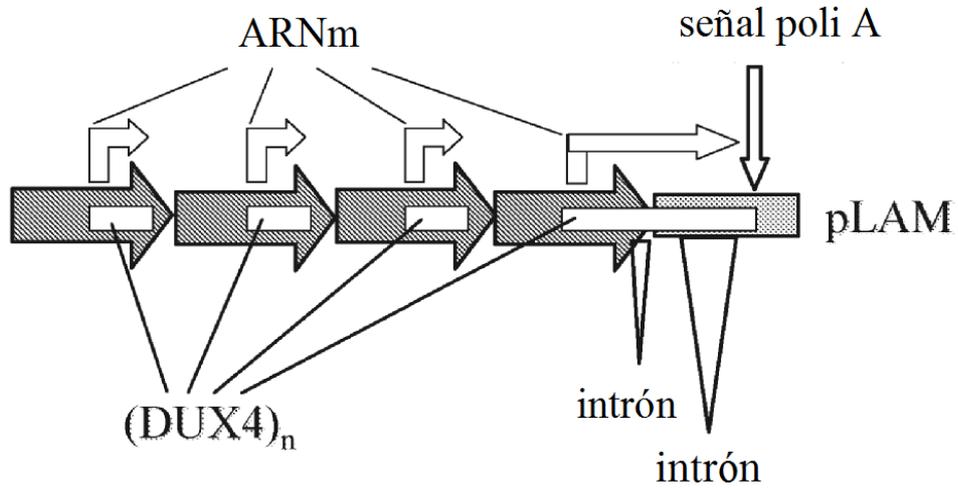


FIGURA 3

```

12001 agaaacggag gccccggggg agctggaggc ctcggaagag gccgcctcgc tggaaacacc
12061 cctcagcgag gaagaatacc gggctctgct ggaggagctt taggacgcgg ggttgggacg
12121 gggtcgggtg gttcggggca gggccgtggc ctctctttcg cggggaacac ctggctggct
12181 acggaggggc gtgtctccgc cccgccccct ccaccgggct gaccggcctg ggattcctgc
12241 cttctaggtc taggcccgtg gagagactcc acaccgcgga gaactgccat tctttcctgg
12301 goatcccggg gatcccagag ccggcccagg tacctgcgca cgcgcggggt tgcgggcagc
12361 cgcttgggct gtgggagcag cccgggcaga gctctcctgc ctctccacca gccacccccg
12421 ccgctgacc gccccctccc cccccccac cccccacccc cggaaaacgc gtcgtcccct
12481 gggctgggtg gagacccccg tcccgcaaaa caccgggccc cgcgcagcgt ccgggcctga
12541 ctccgctccg gcggctcgcc tctgtgtgtc ccccgcgcca ccgtcgcccg ccgcccggg
12601 cccctgcagc ctcccagctg ccagcgcgga gtcctggcg gtcaaaagca tacctctgtc
12661 tgtctttgcc cgcttctctg ctagacctgc ggcagtgcg caccocggct gacgtgcaag
12721 ggagctcgtt ggctctctg tgcccttgtt cttccgtgaa attctggctg aatgtctccc
12781 cccaccttcc gacgctgtct aggcaaacct ggattagagt tacatctcct ggatgattag
12841 ttcagagata tattaatatg cccctccct gtggatccta tagaagattt gcatcttttg
12901 tgtgatgagt gcagagatat gtcacaatat cccctgtaga aaaagcctga aattggttta
12961 cataacttcg gtgatcagtg cagatgtggt tcagaactcc atagtagact gaacctagag
13021 aatggttaca tcacttaggt gatcagtgta gagatatggt aaaattctcg tgtagacaga
    
```

(SEQ ID NO: 1)

FIGURA 2

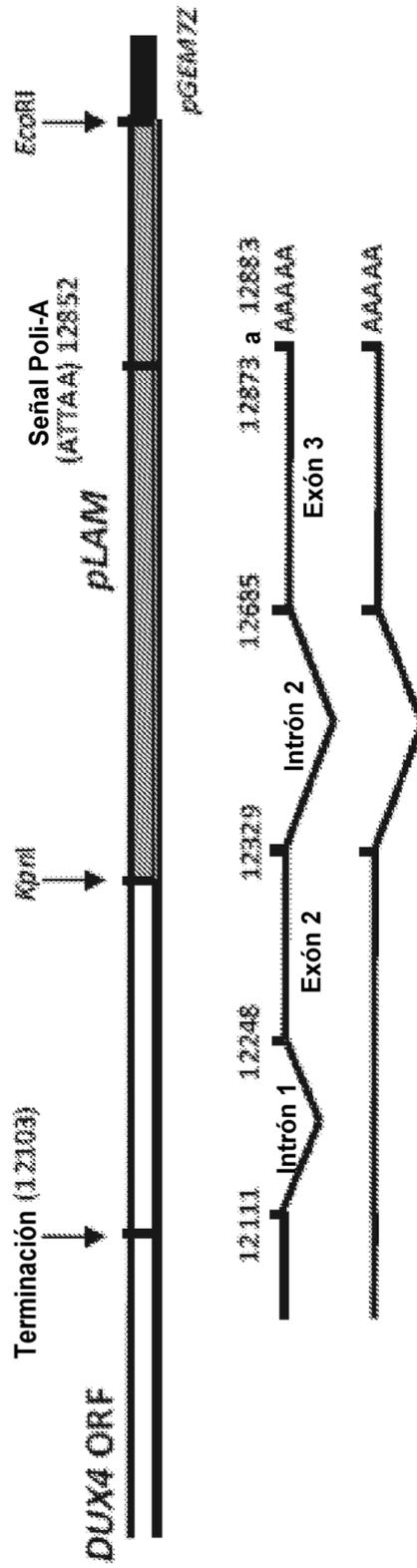


FIGURA 4

CCACCCCCCCCCCCCCACCACCACCACCACCACCACCACCCCGCCGGCCGGCCCCAG  
 GCCTCGACGCCCTGGGTCCCTTCCGGGGTGGGGCCGGGCTGTCCCAGGGGGGCT  
 CACCGCCATTCA**ATG**AAGGGGTGGAGCCTGCCTGCCTGTGGGCCTTTACAAGGG  
 CGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGTCCGGGCAGGCCTCCTGGCTGCACCTGCCGC  
 AGTGCACAGTCCGGCTGAGGTGCACGGGAGCCCGCCGGCCTCTCTCTGCCCGC  
 GTCCGTCCGTGAAATTCCGGCCGGGGCTCACCGCGATGGCCCTCCCGACACCC  
 TCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGGACGGCGACGGAGAC  
 TCGTTTGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCTTTGAGCGGAAC  
 CCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCCATCGGCATTCC  
 GGAGCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTACGCCAGCTGAGGC  
 AGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGGCCCGCCAGAAGG  
 CCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAG  
 CCTTTGAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGA  
 GAGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGC  
 CAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCAGGCCTGTGC  
 AGCGCGGCCCCCGGCGGGGGTACCCTGCTCCTCGTGGGTGCCTTCGCCCA  
 CACCGGCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTG  
 GGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCG  
 CTGCAGCCAGCCAGGCCGCGCCGGCAGAGGGGGTCTCCAACCTGCCCCGGC  
 GCGCGGGGATTTGCGCTACGCCGCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCCC  
 ACCCTCAGGCTCCTCGGTGGCCTCCGCACCCGGGCAAAAGCCGGGAGGACCGG  
 GACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCC  
 CGCTCAAGCGGGGCCGAGGGCCAAGGGGTGCTTGCGCCACCCACGTCCCAGG  
 GGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGTCGCCGGGGCGGCGTG  
 GGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGCCCCCGGACGCCT  
 CCGCCTCCGCGCGGCAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGGGCGCCCTCCCAGGCG  
 CTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTGGATGA  
 GCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACGG  
 AGGCCCCGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCTCGCTGGAAGCACC  
 CCTCAGCGAGGAAGAATAACGGGCTCTGCTGGAGGAGCTT**TAG**GACGCGGGG  
*TTGGGACGGGGTCTGGGTGGTTCGGGGCAGGGCCGTGGCCTCTCTTTCGCGGGGAA*  
*CACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCGCCCCCTCCACCGGGCTGA*  
*CCGGCCTGGGATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACC*  
**GCGGAGAACTGCCATTCTTTCTGGGCATCCCGGGGATCCCAGAGCCGGC**  
**CCAGACCTGCGCGCAGTGCGCACCCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGG**  
CCTCTCTGTGCCCTTGTCTTCCGTGAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCACCT  
TCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTGGATTAGAGTTACATCTCCTGGATGATTAGT  
TCAGAGATATATTAATAATGCCCCCTCCCTGTG

(SEQ ID NO: 42)

FIGURA 5

CCACCCCCCCCCCCCCACCACCACCACCACCACCACCACCCCGCCGGCCGGCCCCAG  
 GCCTCGACGCCCTGGGTCCCTTCCGGGGTGGGGCGGGCTGTCCCAGGGGGGCT  
 CACCGCCATTC[ATG]AAGGGGTGGAGCCTGCCTGCCTGTGGGCCTTTACAAGGG  
 CGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGTCCGGGCAGGCCTCCTGGCTGCACCTGCCGC  
 AGTGCACAGTCCGGCTGAGGTGCACGGGAGCCCGCCGGCCTCTCTCTGCCCGC  
 GTCCGTCCGTGAAATTCCGGCCGGGGCTCACCGCGATGGCCCTCCCGACACCC  
 TCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCGGGGACGAGGACGGCGACGGAGAC  
 TCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGCTTTGAGCGGAAC  
 CCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCCAGGCCATCGGCATTCC  
 GGAGCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTCACGCCAGCTGAGGC  
 AGCACCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCAGGAGACGCGGCCCGCCAGAAGG  
 CCGGCGAAAGCGGACCGCCGTCACCGGATCCAGACCGCCCTGCTCCTCCGAG  
 CTTTGTAGAAGGATCGCTTTCCAGGCATCGCCGCCCGGGAGGAGCTGGCCAGA  
 GAGACGGGCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTCAGAATCGAAGGGC  
 CAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCGCGCAGGCAGGCGGCCTGTGC  
 AGCGCGGCCCCGGCGGGGGTACCCTGCTCCCTCGTGGGTGCGCTTCGCCA  
 CACCGGCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACGTGCCCTGCGCGCCTG  
 GGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAGGGCCGCCCCCGCG  
 CTGCAGCCAGCCAGGCCGCGCCGGCAGAGGGGGTCTCCCAACCTGCCCCGGC  
 GCGCGGGGATTTGCGCTACGCCGCCCGGCTCCTCCGGACGGGGCGCTCTCC  
 ACCCTCAGGCTCCTCGGTGGCCTCCGCACCCGGGCAAAGCCGGGAGGACCGG  
 GACCCGCAGCGCGACGGCCTGCCGGGCCCTGCGCGGTGGCACAGCCTGGGCC  
 CGCTCAAGCGGGGCCGAGGGCCAAGGGGTGCTTGCGCCACCCACGTCCAGG  
 GGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCCAGGTCGCCGGGGCGGCGTG  
 GGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCCAGCCCGCGCCCCCGGACGCT  
 CCGCCTCCGCGCGGAGGGGCAGATGCAAGGCATCCCGGCGCCCTCCAGGCG  
 CTCCAGGAGCCGGCGCCCTGGTCTGCACTCCCCTGCGGCCTGCTGCTGGATGA  
 GCTCCTGGCGAGCCCGGAGTTTCTGCAGCAGGCGCAACCTCTCCTAGAAACGG  
 AGGCCCCGGGGGAGCTGGAGGCCTCGGAAGAGGCCGCTCGCTGGAAGCACC  
 CCTCAGCGAGGAAGAATAACGGGCTCTGCTGGAGGAGCTT[TAG]GACGCGGGG  
**TCTAGGCCCGGTGAGAGACTCCACACCGCGGAGAACTGCCATTCTTTCCCT**  
GGGCATCCCGGGGATCCAGAGCCGGCCCAGACCTGCGCGCAGTGCAC  
CCCGGCTGACGTGCAAGGGAGCTCGCTGGCCTCTCTGTGCCCTTGTCTTCCGT  
GAAATTCTGGCTGAATGTCTCCCCCACCTTCCGACGCTGTCTAGGCAAACCTG  
GATTAGAGTTACATCTCCTGGATGATTAGTTACAGAGATATATAAAATGCCCC  
TCCCTGTG

(SEQ ID NO: 43)

FIGURA 6

ggagggcgggctaccccgggaccttgggccccgagctcatgcatgttcataacgcggtgga  
ggtggtaggtctttctaagggcctcctggctgcacctgccgcagtgcacaggccggctgag  
gtgcacgggagcccgcggcctctctctgcccgcgtccgtccgtgaaattccggccggggc  
tcaccgcg[atg]gccctcccgacaccttcggacagcacctccccgcggaagcccggggac  
gaggacggcgacgggagactcgtttggacccccgagccaaagcgaggccctgcgagcctgctt  
tgagcggaaaccgtagccgggcatcgccaccagagaacggctggcccaggccatcggcatt  
ccggagcccagggtccagatttggtttcagaatgagaggtcacgccagctgaggcagcacc  
ggcgggaatctcggccctggcccgggagacgcggcccgcagaaggccggcgaaagcggac  
cgccgtcaccggatcccagaccgcctgctcctccgagcctttgagaaggatcgctttcca  
ggcatcgccgcccgggaggagctggccagagagacgggcctcccggagtccaggattcaga  
tctggtttcagaatcgaagggccaggcaccccgggacaggggtggcagggcgcccgcgaggc  
aggcggcctgtgcagcgcggccccggcgggggtcacctgctcctcgtgggtcgcttc  
gcccacaccggcgctggggaacggggcttcccgcaccccacgtgcctgcgcgctgggg  
ctctcccacagggggcttctgtgagccaggcagcgagggccgccccgcgctgcagcccag  
ccaggccgcgcccggcagaggggatctcccaacctgccccggcgcgcggggatttcgcctac  
gcccggccggctcctcggacggggcgctctcccacctcaggetcctcgggtggcctccgc  
accggggcaaaagccgggaggaccgggacccgcagcgcgacggcctgcccgggcccctgcg  
ggtggcacagcctgggcccgtcaagcggggccgcagggccaaggggtgcttgcgccacc  
acgtcccaggggagtcctgtgggtggggctggggccgggggtcccaggtcgccggggcgcg  
gggaaccccaagccggggcagctccacctcccagcccgcgccccggagcgcctccgcggc  
aagcacagatgccagccatccaggcgcctcccacccgctccaggagccggggcgctcgtct  
acagtcacctccagcctgttatatgagctcctg[tag]acaccagagtttcagcaaaaggca  
cgaccttcttagatccggcgccactgggggagctgaaggacgtggaagagcccgctctgc  
tggaaccactcctcagccaggaagaacaccgggctctgctggaggagcaggttgagcggg  
gttggggcgggtgggggcaggacggcgccctctcttctcgcggtgaacctctgactcggta  
tgagagggcgtgccttccctccagctgacctgtctaggatccctgagttccagggtccggt  
gagagactccacacagaggaggctgtcattcttctcctgagcatcccggggatcccagggc  
ccgcccaggtagccgggaggtggactgtctactgcgcgatgcgcaggtttgcaggcagcagcc  
taggtttt

(SEQ ID NO: 50)

FIGURA 7

ggagggcgggctaccccgggaccttgggccccgagctcatgcatgttcataacgcggtgga  
 ggtggtaggtctttctaagggcctcctggctgcacctgccgcagtgcacagggccggctgag  
 gtgcacgggagcccgcggcctctctctgcccgcgtccgtccgtgaaattccggccggggc  
 tcaccggaatggccctcccgcacaccttcggacagcacccctcccgcgggaagcccggggac  
 gaggacgggcgagactcgtttggaccccagaccaaagcgaggccctgcgagcctgctt  
 tgagcggaaaccgtacccgggcatcgccaccagagaacggctggcccaggccatcggcatt  
 ccggagcccagggtccagatttggtttcagaatgagaggtcacgccagctgaggcagcacc  
 ggccgggaatctcggccctggcccgggagacgcggcccgcagaaggccggcgaaagcggac  
 cggcgtcaccggatcccagaccgcctgctcctccgagcctttgagaaggatcgctttcca  
 ggcacgcgcggcccgggaggagctggccagagagacgggcctcccggagtcaggattcaga  
 tctggtttcagaatcgaaggccaggcaccgggacaggggtggcagggcgcccgcgagggc  
 aggcggcctgtgcagcggccccggcgggggtcaccctgctcctcgtgggtcgcttc  
 gccacaccggcgcggtggggaacggggctcccgcaccccacgtgccctgcgcgctgggg  
 ctctcccacagggggctttcgtgagccaggcagcagggccgccccgcgctgcagcccag  
 ccaggccgcgcccggcagaggggatctcccacctgccccggcgcgggggatttcgectac  
 gccgcccggctcctccggacggggcgctctcccacctcaggctcctcgggtggcctccgc  
 acccgggcaaaagccgggaggaccgggacccgcagcgcgacggcctgcccgggcccctgcgc  
 ggtggcacagcctgggcccgcctcaagcggggccgcagggccaaggggtgcttgcgccacc  
 acgtcccaggggagtcctggtggggctggggccggggctcccaggctcggccggggcggt  
 gggaaacccaagccggggcagctccacctcccagcccgcgccccggacgcctccgcggc  
 aagcacagatgccagccatccaggcgcctcccacccgctccaggagccggggcgctcgtct  
 acagtcacctccagcctggtatatgagctcctgtagacaccagagtttcagcaaaaggca  
 cgacctttcctagatccggcgccactgggggagctgaaggacgtggaagagcccgcctctgc  
 tggaaacctcctcagccaggaagaacaccgggctctgctggaggagcaggttggagcggg  
 gttggggcggggtgggggcaggacggcgccctctctttcgcggtgaacctctgactcggta  
 tggagaggcgctgccttcccttccagctgacctgtctaggatccctgagttccaggctccgg  
 gagagactccacacagaggagggtgtcattctttcctgagcatcccggggatcccagggc  
 ccgcccaggtagccgggaggtggactgtctactgcgcatgcgaggtttgcaggcagcagcc  
 taggttttccaaccagcccaggcggagctctcattcctttttcccagcgttcttcagtcg  
 agttggcggagacctcagtcgcggaagcgctgggcccggggcagaagccaggccagttctcc  
 tttcgtggctcagctcctctgcctcttcgctcaccaacacttgccaacccccgctcccgc  
 agcctcctcgccag

(SEQ ID NO: 51)

FIGURA 8

ATGTCCTTATCGTCACTTCCGTGTCATCCTATCCCTGACCTCCCCACAGCCCACA  
 GCTCTTGTACATAGGCCAGCGGGACCTCGCACTCCGGGAAAACGTGGGGTGGCC  
 GGTGCAGGCCGAGAGCTCGGCCACAGCCGCTGCTTGCGGGGCGCCACC  
 AGCTCACCAGCCCTCCGGATCGCCGGCCCGGGGACCTGTTGCTCGCGTGTCT  
 CCCGCCCCGAAAGCGCGACCACGTTGGCTGTTTCCCGAGCTCTGCGGGGACA  
 CAGAAACCTCCAGCGAAGCGTGGAAGCAGCATCGTGACTTCGCTCTCCTTT  
 CCGGTTTCCAGACCGGCCACAGTGGAGACTCCCCTTGTTGCAGGAAACAGGAA  
 TCCGTGGTCAGGCCAATTACTGGAGAACCTCAGAGAGCCAGCCCCGGAAGCCC  
 CTCTTTCCCTCCAATCCGGCCCTGCACCCACCCACCCACAAGGCCCTGGTCC  
 CTGTGGTTTTTCGGCTTCGGAGGGCGGGCTACCCCGGGACCTTGGGCCCCGAGC  
 TCATGCATGTTACATAACCGCGGTGGAGGTGGTAGGTCTTTCTAAGGGCCTCCTGG  
 CTGCACCTGCCGCAGTGCACAGGCCGGCTGAGGTGCACGGGAGCCCCGCCGGCC  
 TCTCTCTGCCCCGCTCCGTCCGTGAAATTCCGGCCGGGGCTACCCGCG[ATG]GC  
 CCTCCCGACACCCTCGGACAGCACCTCCCCGCGGAAGCCCCGGGGACGAGGAC  
 GCGACGGAGACTCGTTTGGACCCCGAGCCAAAGCGAGGCCCTGCGAGCCTGC  
 TTTGAGCGGAACCCGTACCCGGGCATCGCCACCAGAGAACGGCTGGCCAGGC  
 CATCGGCATTCCGGAGCCAGGGTCCAGATTTGGTTTCAGAATGAGAGGTAC  
 GCCAGCTGAGGCAGCACCCGGCGGGAATCTCGGCCCTGGCCCGGGAGACGCGG  
 CCCGCCAGAAGGCCGGCGAAAGCGGACCCGCCGTCACCCGATCCAGACCCGCC  
 CTGCTCCTCCGAGCCTTTGAGAAGGATCGCTTTCAGGCATCGCCGCCGGGA  
 GGAGCTGGCCAGAGAGACGGGCCTCCCGGAGTCCAGGATTCAGATCTGGTTTC  
 AGAATCGAAGGGCCAGGCACCCGGGACAGGGTGGCAGGGCGCCCCGCGCAGGC  
 AGGCGGCCTGTGCAGCGCGGCCCTGGCGGGGGTACCCCTGCTCCCTCGTGGG  
 TCGCCTTCGCCACACCCGGCGCGTGGGGAACGGGGCTTCCCGCACCCACGTC  
 CCCTGCGCGCCTGGGGCTCTCCACAGGGGGCTTTCGTGAGCCAGGCAGCGAG  
 GGCCGCCCCCGCGCTGCAGCCAGCCAGGCCGCGCCGGCAGAGGGGGTCTCCC  
 AACCTGCCCCGGCGCGCGGGGATTTCCGCTACGCCGCCCGGCTCCTCCGGAC  
 GGGGCGCTCTCCACCCTCAGGCTCCTCGGTGGCTCCGCACCCGGGCAAAG  
 CCGGGAGGACCGGGACGCGCAGCGCAGCGGCTGCCGGGCCCTGCGCGGTG  
 GCACAGCCTGGGCCCGCTCAAGCGGGGCCGAGGGCCAAGGGGTGCTTGCGC  
 CACCCACGTCCAGGGGAGTCCGTGGTGGGGCTGGGGCCGGGGTCCCAGGTC  
 GCCGGGGCGGCGTGGGAACCCCAAGCCGGGGCAGCTCCACCTCCCAGCCCGC  
 GCCCCCGGACGCCTCCGCGGCAAGCACAGATGCCAGCCATCCAGGCGCCTCCC  
 AACCGCTCCAGGAGCCGGGGCGCTCGTCTACAGTCACCTCCAGCCTGTTATAT  
 GAGTCCTG[TAG]ACACCAGAGTTTCAGCAAAGGCACGACCTTTCCTAGATCC  
 GGCGCCACTGGGGGAGCTGAAGGACGTGGAAGAGCCCGCTCTGCTGGAACCA  
 CTCTCAGCCAGGAAGAACACCGGGCTCTGCTGGAGGAGCAGAGGTGCTGTT  
 GCTCAAGTCTCTGCCCCGCCCCCGAAAGTGTGACCATGTTGACTGTTTGT  
 CCCGAGCTCTGTGGGGACCCAGAAACTTCCAGGAATGCGTGGAACACCAGCAT  
 CGTTTGTGAGTGCGCCCGTCCCTGTGGTGGGAGCAGTGGCCCCGAGCGTGCC  
 CACGGGCCCCGGCTTGGGTTTCTCTCGTGTTTAGAATGGTATGGCCGTAGACAA  
 TGGCGGTGGCGCCTGGCTGGTCCAAGAGCCCGGTCCAGCTACGCGCGTCTGAT  
 TCCAGGCGTCAACACCAACCCGGGGCCGCGAGGCTGGGATCAGGCACCCCGG  
 AGCCGCTCGCCCGCGGCCGGGCTGCTCTCCCCCTCTATACGCCCAAGCACCAG  
 TCGCCGCGCTGCGTTTTTCCGCGGCCCTCGCAGAGCGTCCCGCTATCGCCGGCGG  
 CCAGACCACGCGCAGGACCGCTGA (SEQ ID NO: 52)

FIGURA 9

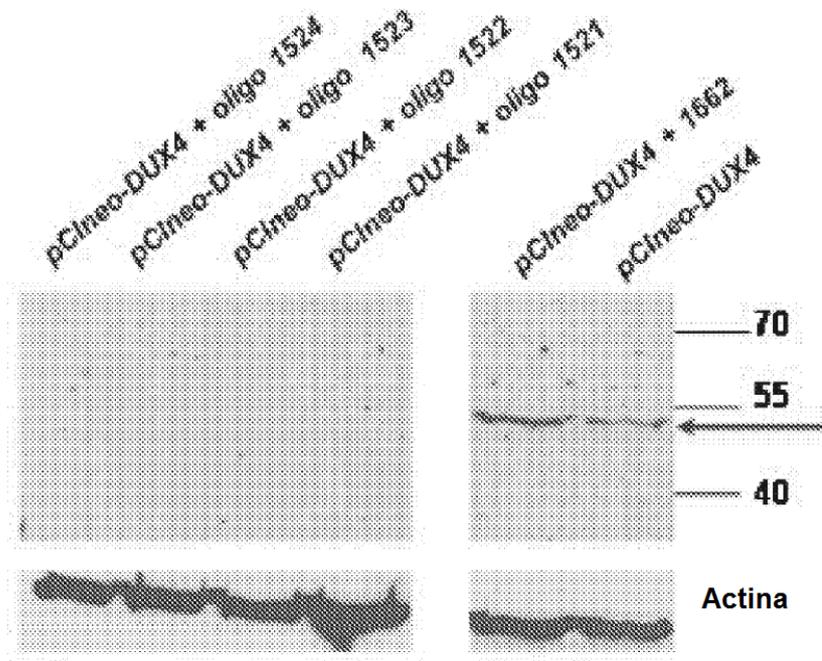


FIGURA 10

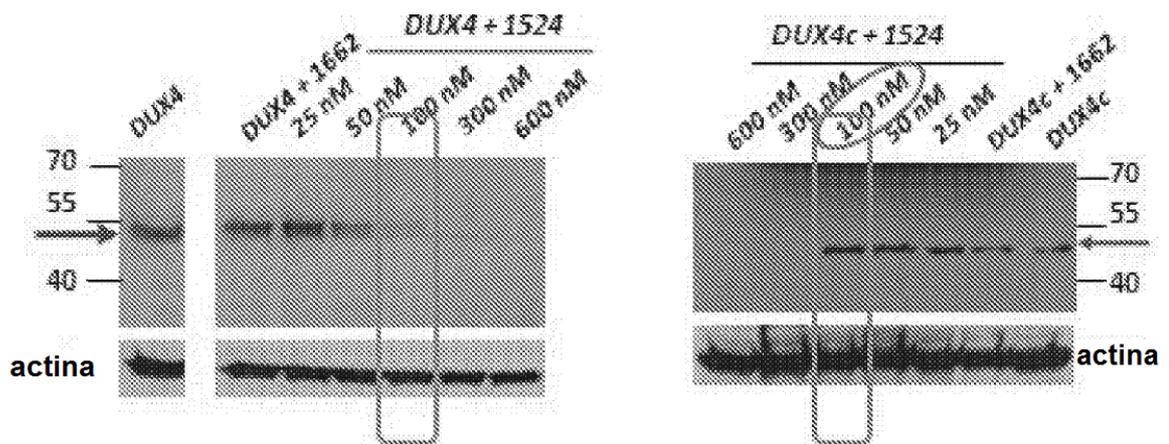


FIGURA 11

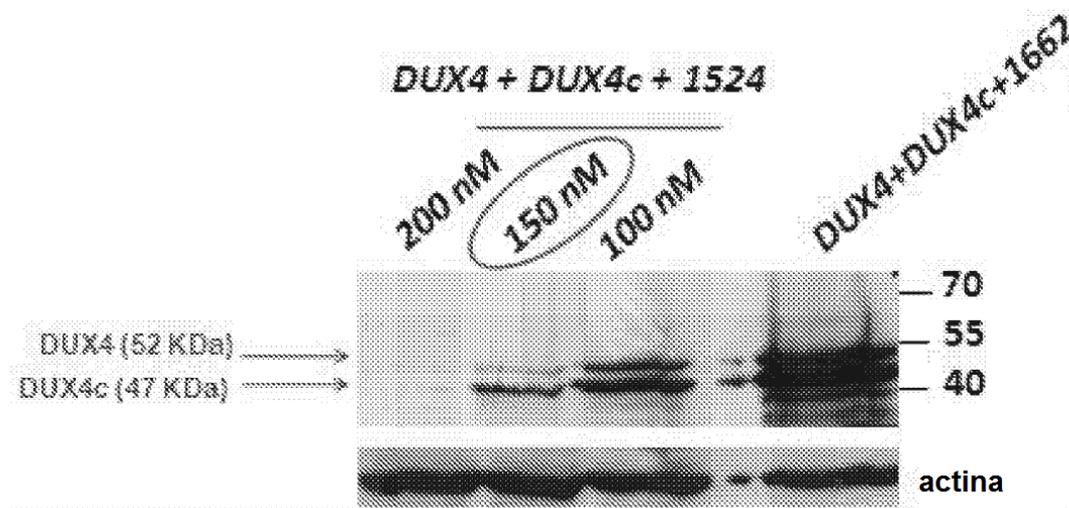


FIGURA 12

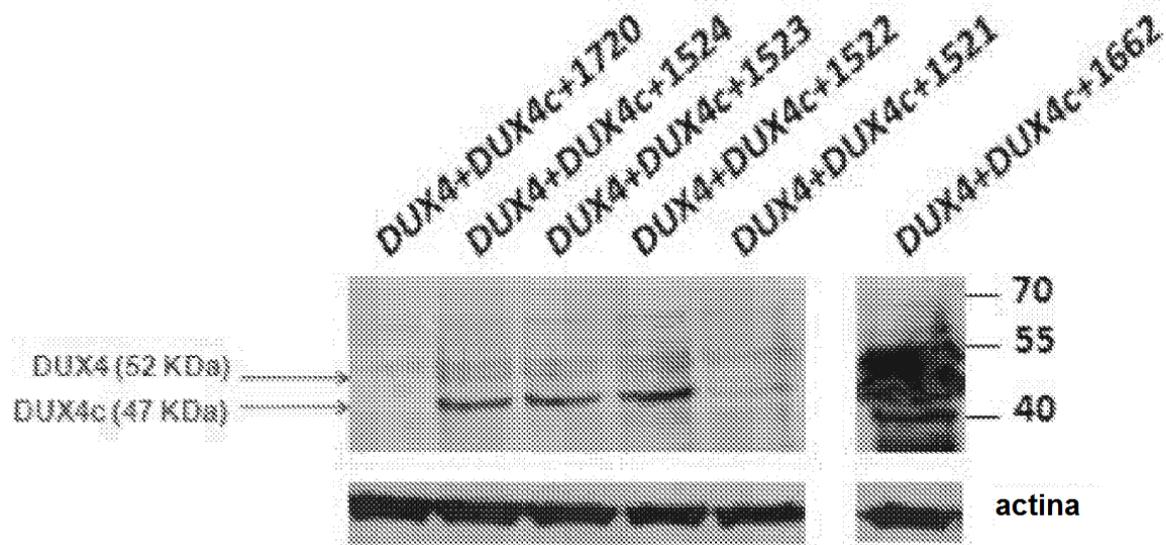


FIGURA 13 (A)

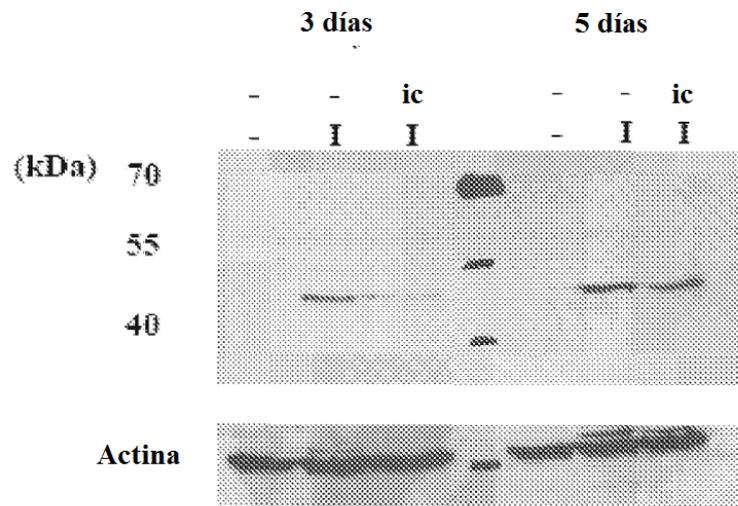


FIGURA 13 (B)

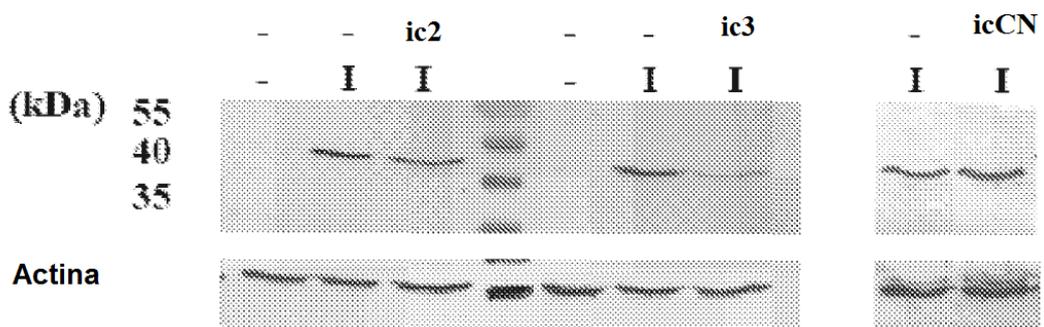


FIGURA 14

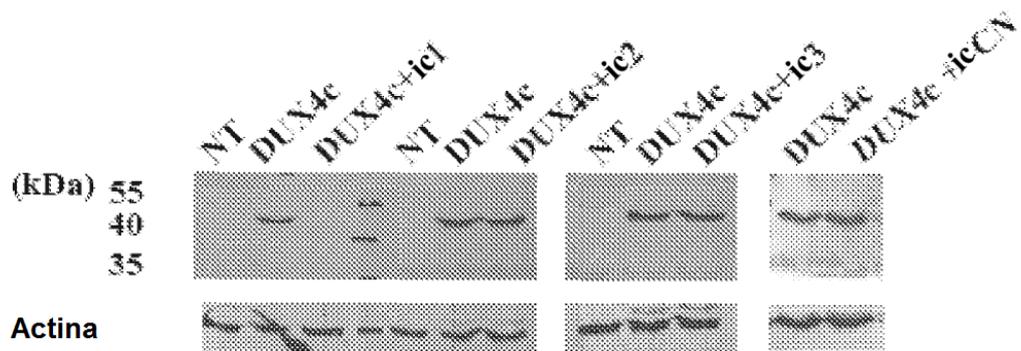


FIGURA 15

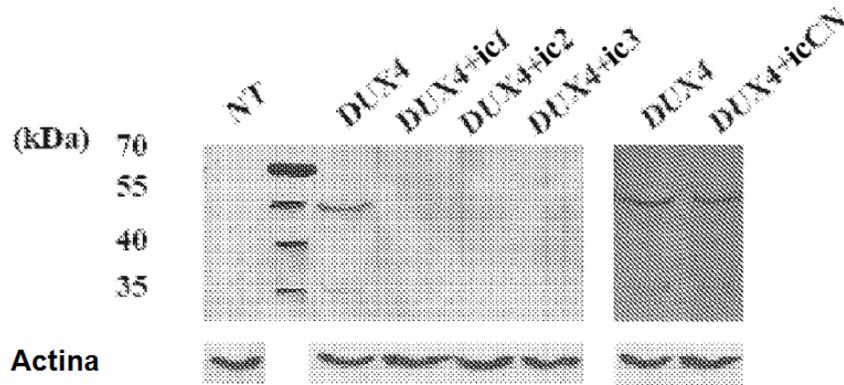


FIGURA 16

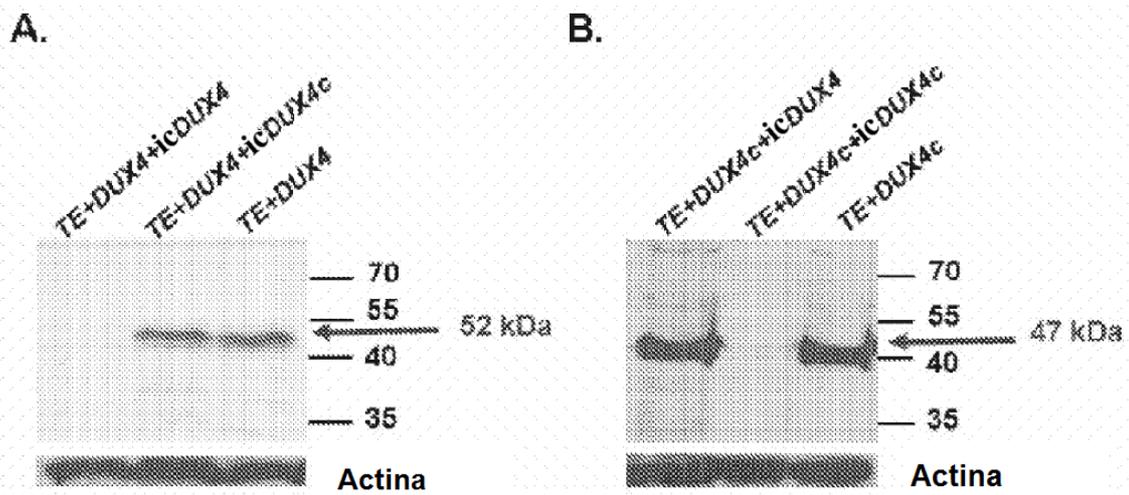


FIGURA 19

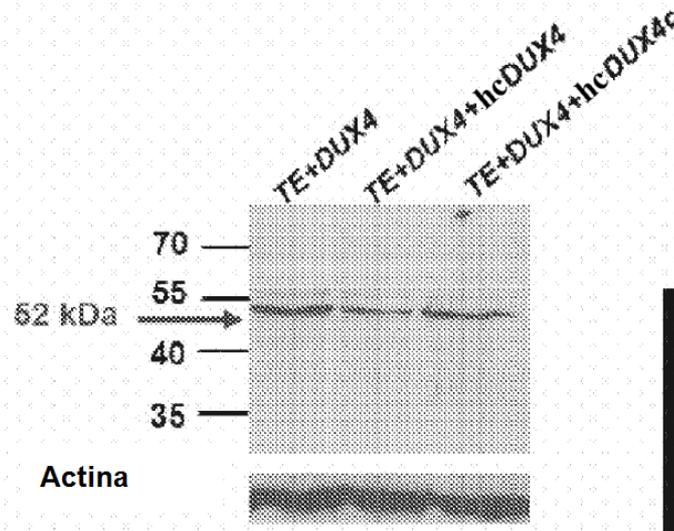


FIGURA 17

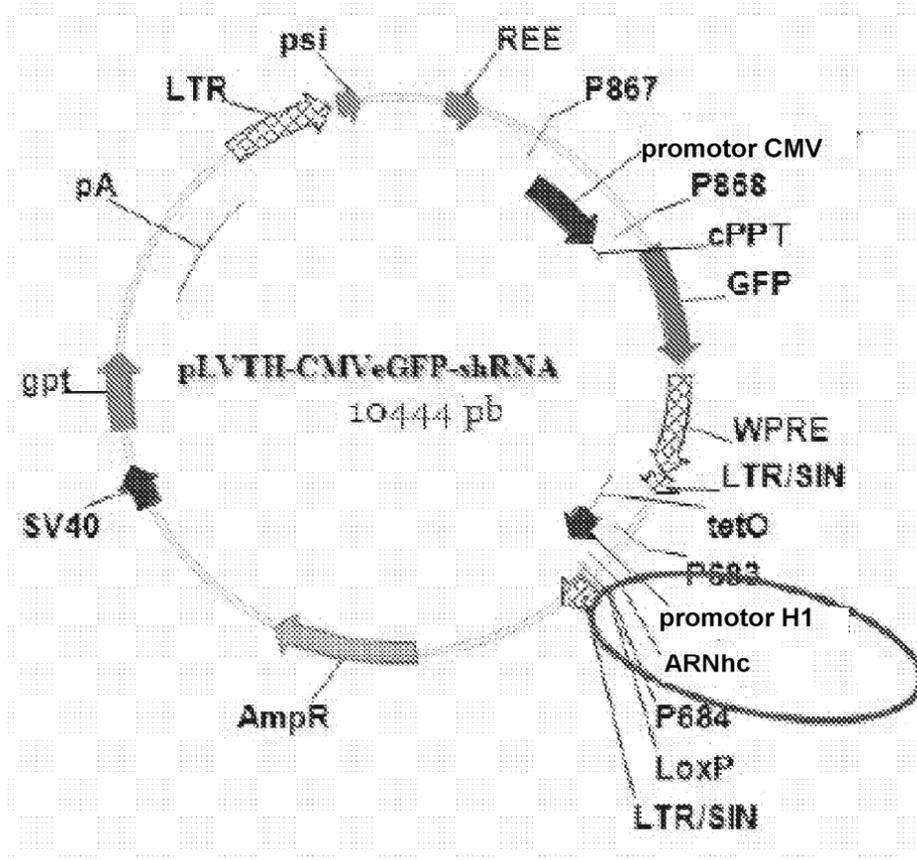


FIGURA 18



FIGURA 20

MKGWSLPACGPLQGRLAGWLAVRAGLLAAPAAVHSPAIEVHGSPPASLCPRPSVKFRPG  
LTAMALPTPSDSTLPAEARGRRRRRLVWTPSQSEALRACFERNPYPGIATRERLAQAI  
GIPEPRVQIWFQNERSRQLRQHRRESRPWPGRRGPPEGRRKRTAVTGSQTALLLRAFE  
KDRFPGIAAREELARETGLPESRIQIWFQNRARRHPGQGGRAPAQAGGLCSAAPGGGH  
PAPSWWAFHAHTGAWGTGLPAPHVPCAPGALPQGAFVSQAARAAPALQPSQAAPAEV  
SQPAPARGDFAYAAPPDGLSHQPAPRWPPHPGKSREDRDPQRDGLPGPCAVAQP  
GPAQAGPQQGVLAPPTSQGSPPWWGWRGPQVAGAAWEPQAGAAPPQPAPPDAS  
ASARQQMQGIPAPSQALQEPAPWSALPCGLLLDELLASPEFLQQAQPLLETEAPGELE  
ASEEAASLEAPLSEEEYRALLEEL (SEQ ID NO: 59)

FIGURA 21

MALPTPSDSTLPAEARGRRRRRLVWTPSQSEALRACFERNPYPGIATRERLAQAIGIPE  
PRVQIWFQNERSRQLRQHRRESRPWPGRRGPPEGRRKRTAVTGSQTALLLRAFEKDR  
FPGIAAREELARETGLPESRIQIWFQNRARRHPGQGGRAPAQAGGLCSAAPGGGH  
PAPSWWAFHAHTGAWGTGLPAPHVPCAPGALPQGAFVSQAARAAPALQPSQAAPAEV  
SQPAPARGDFAYAAPPDGLSHQPAPRWPPHPGKSREDRDPQRDGLPGPCAVAQP  
GPAQAGPQQGVLAPPTSQGSPPWWGWRGPQVAGAAWEPQAGAAPPQPAPPDASAAST  
DASHPGASQPLQEPGRSSTVTSSLLYELL (SEQ ID NO: 60)

FIGURA 22

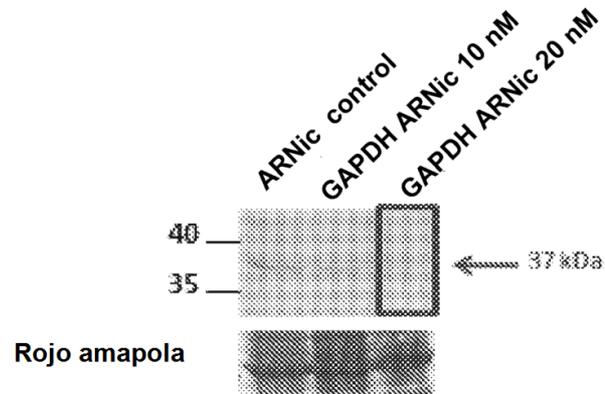


FIGURA 23

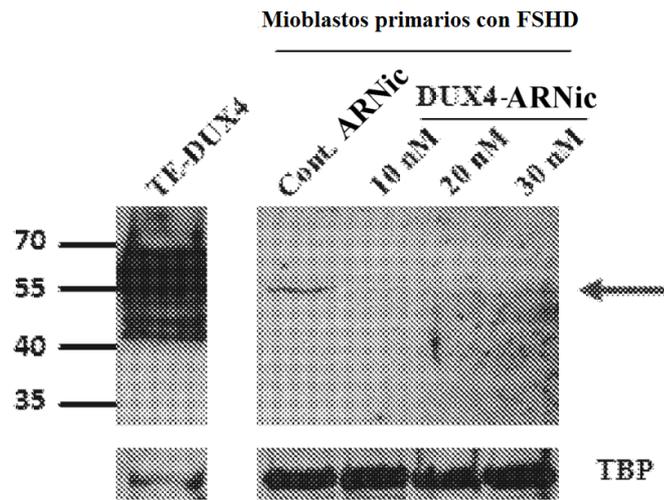


FIGURA 24

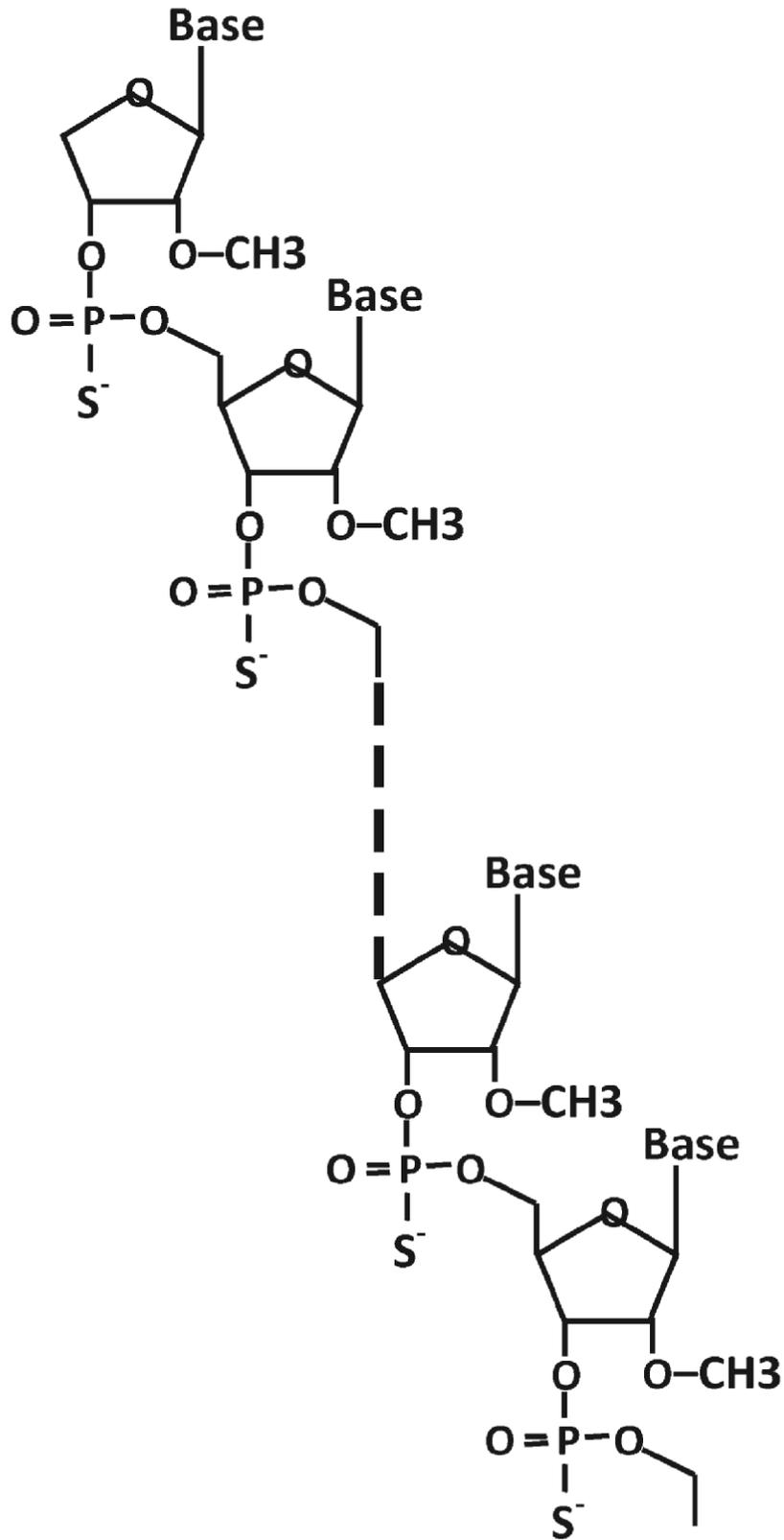




FIGURA 26

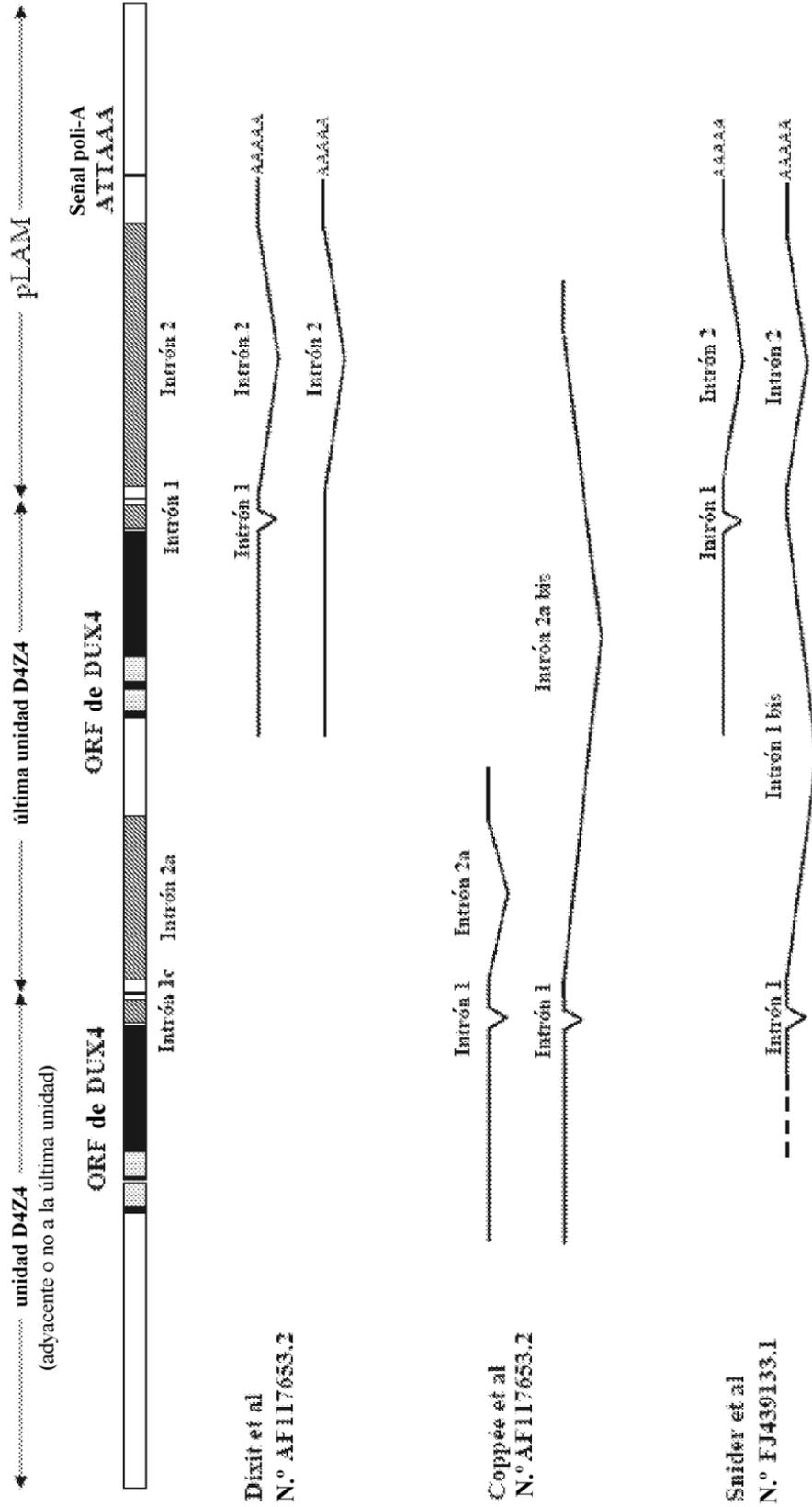


FIGURA 27

pLAM de Gabriëls (SEQ ID NO: 62) corresponde al ARNm de DUX4 de Dixit et al  
 pLAM de Tapscott (SEC ID NO: 63) corresponde al ARNm de DUX4 de Snider et al  
 Unión D4Z4 (SEC ID NO: 61) corresponde al ARNm de DUX4 de Coppée et al

Codón de terminación

inicio (GT o GC) y fin (AG) de intrones: dentro de sitios de corte y empalme donantes y aceptores respectivamente

señal poli A

```

unión D4Z4          CTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGTGGGACGGGGTCGGGTGGTTCGGGGCAGGG
pLAM de Gabriëls   CTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGTGGGACGGGGTCGGGTGGTTCGGGGCAGGG
pLAM de Tapscott    CTCTGCTGGAGGAGCTTTAGGACGCGGGGTGGGACGGGGTCGGGTGGTTCGGGGCAGGG
*****

unión D4Z4          CCGTGGCCTCTCTTTCGCGGGGAACACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCC
pLAM de Gabriëls   CCGTGGCCTCTCTTTCGCGGGGAACACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCC
pLAM de Tapscott    CCGTGGCCTCTCTTTCGCGGGGAACACCTGGCTGGCTACGGAGGGGCGTGTCTCCGCCCC
*****

unión D4Z4          GCCCCCTCCACCGGCTGACCGGCCTGGGATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAG
pLAM de Gabriëls   GCCCCCTCCACCGGCTGACCGGCCTGGGATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAG
pLAM de Tapscott    GCCCCCTCCACCGGCTGACCGGCCTGGGATTCCTGCCTTCTAGGTCTAGGCCCGGTGAG
*****

unión D4Z4          AGACTCCACACCGCGGAGAAGTCCATTCCTTTCCTGGGCATCCCGGGGATCCAGAGCCG
pLAM de Gabriëls   AGACTCCACACCGCGGAGAAGTCCATTCCTTTCCTGGGCATCCCGGGGATCCAGAGCCG
pLAM de Tapscott    AGACTCCACACCGCGGAGAAGTCCATTCCTTTCCTGGGCATCCCGGGGATCCAGAGCCG
*****

unión D4Z4          GCCCAGGTACAGCAGGTGGGCCGCTACTGCGCACGCGGGTTTGGCGGAGCCCGCT
pLAM de Gabriëls   GCCCAGGTACCTGCG-----CAGCGCGGGTTTGGCGGAGCCCGCT
pLAM de Tapscott    GCCCAGGTACAGCAGGTGGGCCGCTACTGCGCACGCGGGTTTGGCGGAGCCCGCT
*****

unión D4Z4          GGGCTGTGGGAGCAGCCCGGGCAGAGCTCTCCTGCCTCTCCACCAGCCACCCCGCCGCC
pLAM de Gabriëls   GGGCTGTGGGAGCAGCCCGGGCAGAGCTCTCCTGCCTCTCCACCAGCCACCCCGCCGCC
pLAM de Tapscott    GGGCTGTGGGAGCAGCCCGGGCAGAGCTCTCCTGCCTCTCCACCAGCCACCCCGCCGCC
*****

unión D4Z4          TGACCGCCCCCTCCCCACCCCCACCCCCACCCCGGAAAACGCGTCGTCCTGGGCT
pLAM de Gabriëls   TGACCGCCCCCTCCCCACCCCCACCCCCACCCCGGAAAACGCGTCGTCCTGGGCT
pLAM de Tapscott    TGACCGCCCCCTCCCCACCCCC-ACCCCCACCCCGGAAAACGCGTCGTCCTGGGCT
*****

unión D4Z4          GGGTGGAGACCCCGTCCCGCGAAACACCGGCCCGCGCAGCGTCCGGGCTGACACCG
pLAM de Gabriëls   GGGTGGAGACCCCGTCCCGCGAAACACCGGCCCGCGCAGCGTCCGGGCTGACTCCG
pLAM de Tapscott    GGGTGGAGACCCCGTCCCGCGAAACACCGGCCCGCGCAGCGTCCGGGCTGACACCG
*****

unión D4Z4          CTCCGGCGGCTCGCTCCTATGCGCCCCCGGCCACCGTCCGCCCGCCCGGGGCCCT
pLAM de Gabriëls   CTCCGGCGGCTCGCTCCTGTGTGCCCCCGGCCACCGTCCGCCCGCCCGGGGCCCT
pLAM de Tapscott    CTCCGGCGGCTCGCTCCTCTGCGCCCCCGGCCACCGTCCGCCCGCCCGGGGCCCT
*****

unión D4Z4          GCAGCCGCCAGGTGCCAGCAGGAGCGCTGGCGCGGAACGCAGACCCAGGCCCGGGC
pLAM de Gabriëls   GCAGCCTCCAGCTGCCAGCGGAGCTCCTGGCGGTCAAAGCATACCTCTGTCTG---
pLAM de Tapscott    GCAGCCTCCAGCTGCCAGCGGAGCTCCTGGCGGTCAAAGCATACCTCTGTCTG---
*****

unión D4Z4          GCACACCGGGACGCTGAGCGTTCAGGCGGGAGGGAAGCGGGCAGAGATGGAGAGAGG
pLAM de Gabriëls   -----TCTTTGCCCGCTTCTG-----
    
```



```

pLAM de Gabriëls -----CACTTAGGTGATCAGTGTAGAGAT-----
pLAM de Tapscottp -----CACTTAGGTGATCAGTGTAGAGAT-----
                        *,** :*** :*:. **,**,**

unión D4Z4          TGTGCGAGACCGTCCCGGCAACGGCGACGCCCACAGGCATTGCCTCCTTCACGGAGAGAG
pLAM de Gabriëls -----ATGTTAAAATTCTCGTGTAGACAG
pLAM de Tapscottp -----ATGTTAAAATTCTCGTGTAGACAG
                        . **...: **, * ** * **

unión D4Z4          GGCCTGGCACACTCAAGACTCCCACGGAGGTTTCAGTTCACACTCCCCTCCACCCCTCCCA
pLAM de Gabriëls AGCCTAGACAATTGTTACATCACCTAGTG-----ATCAGT
pLAM de Tapscottp AGCCTAGACAATTGTTACATCACCTAGTG-----ATCAGT
                        .****,*...* * ::...**,*. * :*:
                                                .** :

unión D4Z4          GGCTGGTTTCTCCCTGCTGCCGACGCGTGGGAGCCCAGAGAGCGGCTTCCCGTTCCCGCG
pLAM de Gabriëls GCAGGGATAAGTCATAAAGCCTCCTGTAGG-----CAGAGTGTAGGCAAGTGTTC---
pLAM de Tapscottp GCAGGGATAAGTCATAAAGCCTCCTGTAGG-----CAGAGTGTAGGCAAGTGTTC---
                        * . **:*:. * ,*.:*** .* :** *****:* .* :. *****

unión D4Z4          GGATCCCTGGAGAGGTCCGGAGAGCCGCCCCCGAAACGCGCCCCCTCCCCCTCCCC
pLAM de Gabriëls ---TCCCTGGGCTGATCAG-----TGCAGAGATATCTCACAAAGCCCT
pLAM de Tapscottp ---TCCCTGGGCTGATCAG-----TGCAGAGATATCTCACAAAGCCCT
                        *****. :*,**.*
                                                :.*. . . . **,*. . . **

unión D4Z4          CTCTCCCCCTTCTCTTCTCGTCTCTCCGGCCCCACCACCACCACCGCCACCACGCCCTCCC
pLAM de Gabriëls ATAAGCCAAACCTTGACAAGGGTTACATCACCTGTTTGAGCAGTGGAATATATATCACA
pLAM de Tapscottp ATAAGCCAAACCTTGACAAGGGTTACATCACCTGTTTGAGCAGTGGAATATATATCACA
                        .*.: **...: * * : . .
                                                . *

                                Extremo del transito D4Z4-D4Z4
                                ↓
unión D4Z4          CCCCCCCCCCCCCCCCCACCACCACCACCACCCGCGCCGCCCCAGGCCTCGA
pLAM de Gabriëls AAGCCCCCTGTAGACAAAGCCCAGACAATTTTTACATCTCCTGAG-----
pLAM de Tapscottp AAGCCCCCTGTAGACAAAGCCCAGACAATTTTTACATCTCCTGAG-----
                        .. ***** . *...**.. **,.* : **, * ** *.
    
```

FIGURA 28

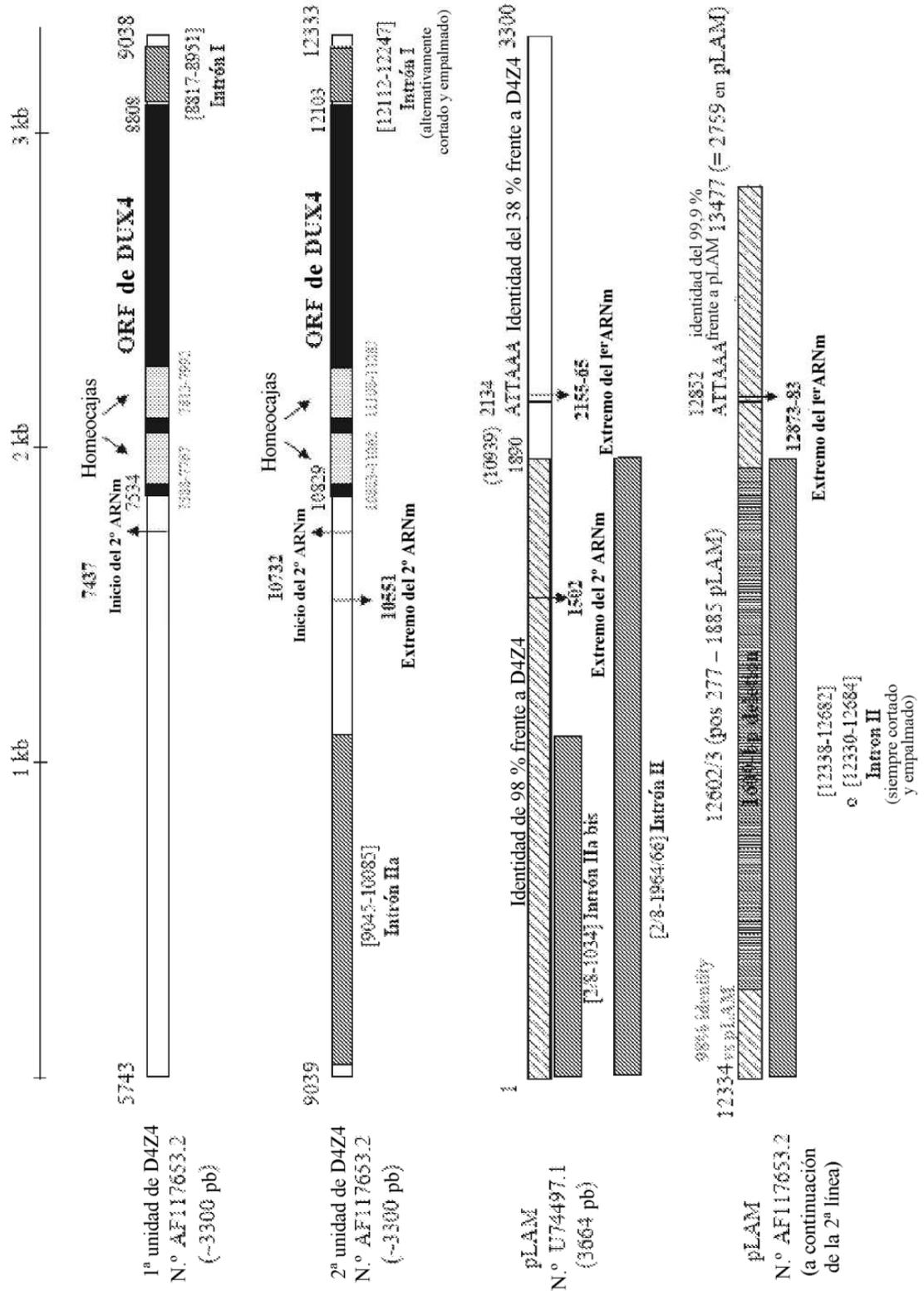


FIGURA 29

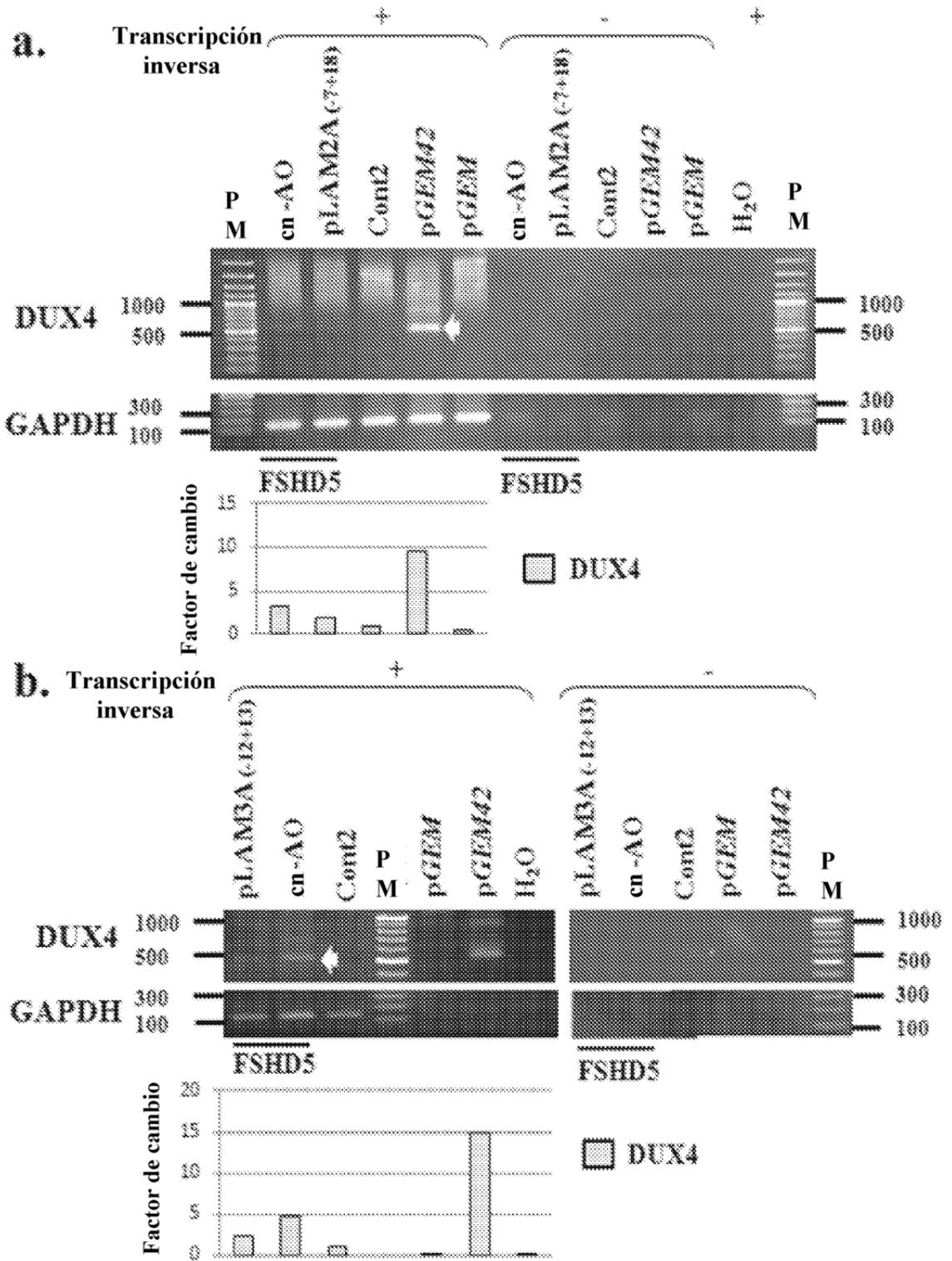


FIGURA 30

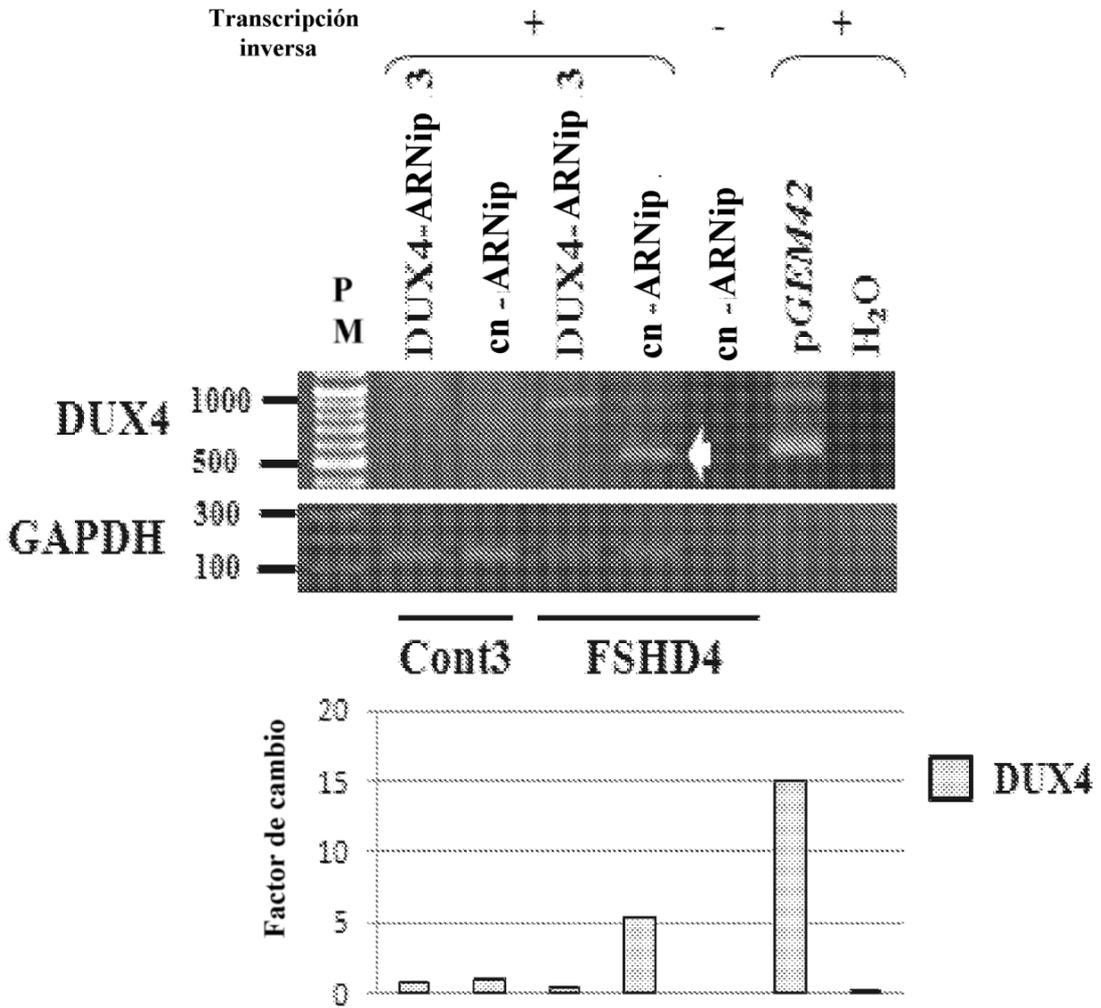
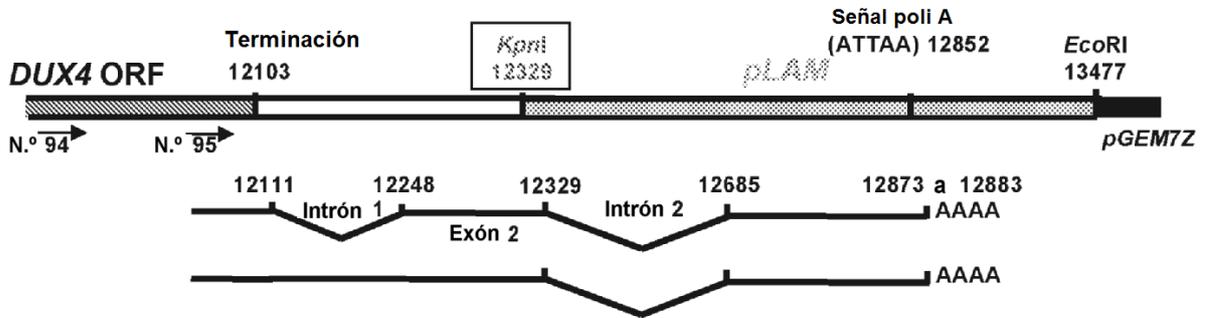


FIGURA 31



```

12001 agaaacggag gccccggggg agctggaggc ctcggaagag gccgcctcgc tggaaacacc
12061 cctcagcgag gaagaatacc gggctctgct ggaggagctt taggacgcgg ggttgggacg
12121 gggtcgggtg gttcggggca gggccgtggc ctctctttcg cggggaacac ctggctggct
12181 acggaggggc gtgtctccgc cccgccccct ccaccgggct gaccggcctg ggattcctgc
12241 cttctagtc taggcccggt gagagactcc acaccgcgga gaactgccat tctttcctgg
12301 gcatcccggg gatcccagag ccggcccagg tacctgcgca cgcgcggggt tgccggcagc
12361 cgcttgggct gtgggagcag cccgggcaga gctctcctgc ctctccacca gcccaccccg
12421 ccgctgacc gccccctccc cccccccac cccccacccc cggaaaacgc gtcgtcccct
12481 gggttgggtg gagacccccg tcccgcgaaa caccgggccc cgcgcagcgt ccgggctga
12541 ctccgctccg gcggetegcc tectgtgtgc ccccgccca ccgctgcccg cccgcccggg
12601 cccctgcagc ctcccagctg ccagcgcgga gctcctggcg gtcaaaagca tacctctgtc
12661 tgtctttgcc cgettctctg ctagacctgc gcgcagtgcg caccccggct gacgtgcaag
12721 ggagctcgct ggcctctctg tgcccttggt cttccgtgaa attctggctg aatgtctccc
12781 cccaccttc gacgtgtct aggcaaacct ggattagagt tacatctcct ggatgattag
12841 ttcagagata tattaaaatg ccccctccct gtggatccta tagaagattt gcatcttttg
12901 tgtgatgagt gcagagatat gtcacaatat cccctgtaga aaaagcctga aattggttta
12961 cataacttcg gtgatcagtg cagatgtggt tcagaactcc atagtagact gaacctagag
13021 aatggttaca tcacttaggt gatcagtgta gagatatggt aaaattctcg tgtagacaga
    
```

FIGURA 32

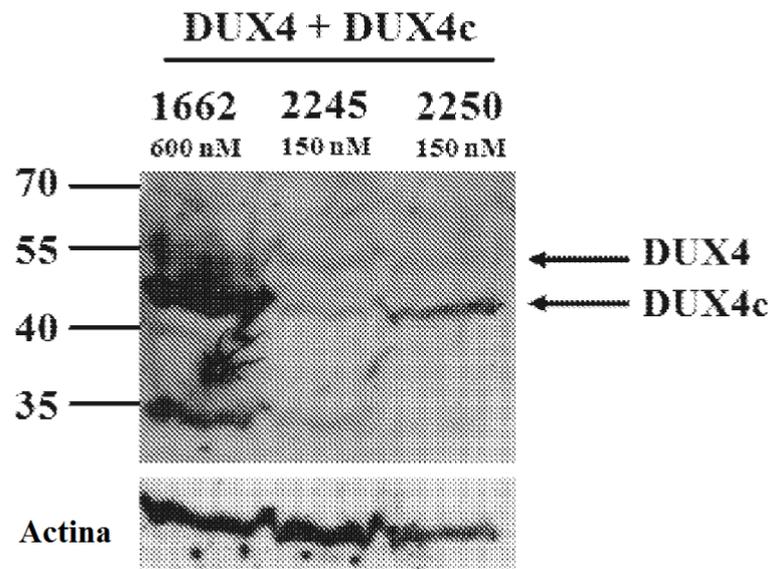


FIGURA 33

