

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 980**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 31/7088** (2006.01)

**A61K 31/7115** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.05.2007 PCT/EP2007/054842**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2007 WO07135105**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2007 E 07729286 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2027267**

54 Título: **Medios y método para la inducción del salto de exón**

30 Prioridad:

**19.05.2006 EP 06076078**

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

**02.06.2017**

73 Titular/es:

**ACADEMISCH ZIEKENHUIS LEIDEN (100.0%)  
ALBINUSDREEF 2  
2333 ZA LEIDEN, NL**

72 Inventor/es:

**AARTSMA-RUS, ANNEMIEKE;  
VAN DEUTEKOM, JUDITH CHRISTINA  
THEODORA y  
VAN OMMEN, GARRIT-JAN BOUDEWIJN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 614 980 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Medios y método para la inducción del salto de exón

5 [0001] La invención se refiere a oligonucleótidos y equivalentes de los mismos y su uso para la inducción de exclusión de exones de ARNm.

[0002] La tecnología antisentido se ha desarrollado considerablemente en los últimos años.

El campo general de tecnología antisentido se puede dividir en diferentes áreas.

10 Una de estas áreas es el campo del salto de exón.

[0003] En este campo, moléculas pequeñas se agregan a la célula para interferir específicamente con el emplame de un ARN mensajero (ARNm) y más específicamente, con la incorporación de, o más bien la falta de incorporación de un exón específico en el ARNm maduro.

15 [0004] En el campo del salto de exón, se pueden distinguir dos métodos generales. Un método focaliza en la interferencia del proceso de emplame enzimático, es decir, la unión física de secuencias exónicas.

20 El otro método se basa en la interferencia con la 'logística' del proceso de empalme, es decir, el reconocimiento de exones por la maquinaria de empalme.

Ambos métodos usan moléculas pequeñas para obtener los efectos deseados.

Las moléculas pequeñas comparten todas la característica de ácidos nucleicos de ser capaces de 'hibridar' secuencias complementarias.

25 Ejemplos de tales pequeñas moléculas son, por supuesto, ARN y ADN, y también ARN modificado y ADN tal como LNA y morfolidos, y simuladores de ácido nucleico tales como PNA.

Estas moléculas son además referidas por el término general de moléculas pequeñas o el término usado más frecuentemente oligonucleótido antisentido (AON).

30 [0005] Las moléculas pequeñas están pensadas para actuar por hibridación a ubicaciones específicas en el pre-ARNm.

La hibridación está pensada para interferir con el proceso enzimático de empalme o el reconocimiento de exones.

[0006] Actualmente, el salto de exón focaliza en la exclusión específica de uno o más exones del ARNm maduro.

35 Sin embargo, también es posible redirigir la maquinaria de empalme de manera que otros exones se incluyan en el ARNm.

Este método es, por ejemplo, de uso en genes que están sujetos a un empalme alternativo.

En estas situaciones, moléculas pequeñas se pueden diseñar redirigiendo la maquinaria de empalme de manera que una alternativa específica se hace más eficazmente.

40 [0007] La WO2006/000057 divulga más de 200 oligonucleótidos para la inducción del salto de un exón del gen DMD. El único exón DMD solo para el que la WO2006/000057 describe el uso de un cóctel de oligonucleótidos para el salto de dicho exón es el exón 20.

45 [0008] En la presente invención se ha descubierto que el proceso de salto de exón se puede hacer más eficazmente. Mucho del trabajo anterior en salto de exón se hizo usando AON que fueron dirigidos hacia el salto de exón en el gen de distrofina.

Hasta la fecha tenemos identificada una serie de 114 AON de exón interno para inducir el salto de 35 exones en células musculares cultivadas (14).

50 Nuestros datos sugieren que AON de exón interno eficaces posiblemente actúan por impedimento estérico de la unión de un miembro de la familia de proteína rica en serina/arginina (SR) sitios de intensificador de empalme exónico (ESE) (15).

Proteínas SR se enlazan con el motivo de secuencia exónica y reclutan otros factores de empalme para mediar el empalme (19).

55 Para más exones que estudiamos, AON diana de un ESE único fue suficiente para inducir niveles significativos de salto de exón (14).

Sin embargo, para algunos exones los rendimientos de salto se redujeron a cero.

En la presente invención, demostramos que los niveles de salto están mejorados por dirigir un exón de distrofina con dos o más AON de exón interno.

60 Con este fin, la invención proporciona un método in vitro para determinar si la eficiencia se puede aumentar con lo cual un exón de distrofina es excluido de un ARNm de distrofina maduro en una célula que produce un precursor de dicho ARNm que contiene un exón

Dicho método comprende la provisión de dicha célula con un primer (AON) oligonucleótido antisentido que puede hibridar una parte interna de exón de dicho exón, y la determinación de si dicha eficiencia se aumenta al proporcionar dicha célula con un segundo AON que puede hibridar otra parte interna de exón de dicho exón, donde dicho exón de distrofina es el exón 45.

65 El aumento de eficiencia se determina preferiblemente por la comparación del nivel con la eficiencia de cualquier

AON solo.

El término eficiencia aumentada como se utiliza en este caso se refiere a la situación donde (i) la cantidad de ARNm de la que el exón diana es excluido es mayor que con cualquier AON solo o donde (ii) el intervalo temporal dentro del que se puede detectar la exclusión del exón diana en dicha célula se aumenta o (iii) una combinación de ambos.

5 Un método de la invención también proporciona robustez adicional cuando se compara con un método de salto de exón utilizando un AON único.

Por lo tanto, la invención proporciona un primer AON que puede hibridar una parte interna de exón de un exón a partir de un precursor del ARNm de distrofina y un segundo AON que puede hibridar otra parte interna de exón de dicho exón para usar en el tratamiento DMD, donde la eficiencia con la cual dicho exón es excluido de un ARNm maduro se aumenta proporcionando dicho segundo AON, donde dicho exón de distrofina es el exón 45.

10

[0009] Normalmente, se refiere a una secuencia como un exón debido a que la secuencia es parte de un pre-ARNm que acaba en un ARNm maduro.

Un pre-ARNm contiene al menos un intrón.

15

El primer exón contiene el sitio tapa mientras que el exón último contiene típicamente la señal poliA.

En la presente descripción, el salto de exón se dirige preferentemente a exones internos.

Un exón interno es cualquiera de los exones 2 a exón n-1, donde n es el número total de exones en dicho pre-ARNm.

Cuando un exón es saltado ya no se incluye en un ARNm maduro.

20

Esta característica podría ser considerada por algunos como que implica que la secuencia ya no es un exón sino una (parte de) un intrón.

Por lo tanto, un exón se define aquí como una secuencia presente en un pre-ARNm, que se incorpora en un ARNm maduro por la maquinaria de empalme de la célula que está expresando dicho pre-ARNm, cuando dicha célula no está provista de un AON que induce el salto de dicho exón.

25

Por lo tanto, un método de salto de exón en la presente divulgación también es referido como un método para cambiar una secuencia exónica en una secuencia intrónica, alternativamente, un método de la divulgación es un método para enmascarar una secuencia exónica de manera que, cuando se enmascara, dicha secuencia exónica ya no está reconocida como un exón por la maquinaria de empalme de una célula.

30

[0010] Una célula puede estar provista de un AON en un número de formas diferentes.

En una forma de realización preferida, dicho AON se proporciona a dicha célula por la incorporación de dicho AON en un vehículo de distribución de gen, preferiblemente, un liposoma.

En otra forma de realización preferida, dicho AON se proporciona a dicha célula mediante un vector que expresa dicho AON o un precursor del mismo.

35

En una forma de realización preferida, dicho vector comprende un vector vírico, preferiblemente, un vector de virus adeno-asociado.

Así la divulgación proporciona además un vehículo de distribución de gen que comprende al menos dos AON de exón interno específicos para el mismo exón.

40

[0011] Usando al menos dos AON de exón internos específicos para el mismo exón para saltar dicho exón hace que el método de la divulgación sea más sólido.

Además, permite el salto eficaz de exones que no saltan eficazmente cuando se usa solo un AON.

Sin pretender imponer ninguna teoría se cree que un AON de exón interno induce el salto de un exón por el impedimento de la unión de las denominadas proteínas SR (Ser-Arg) que enlazan con sitios de intensificador de empalme exónico (ESE).

45

En la presente descripción, se ha observado entre otros que los exones pueden contener los denominados sitios independientes ESE.

Esto significa que cuando la actividad de un sitio ESE se bloquea u obstaculiza por, por ejemplo, por la presencia de un AON en dicho exón, otro ESE independiente en dicho exón permanece funcional.

50

Como este ESE permanece funcional, el exón todavía se incorpora eficazmente al ARNm.

Este efecto se puede contrarrestar dirigiendo todos los sitios ESE independientes en dicho exón.

En este caso, esencialmente todos los sitios ESE están dirigidos así por un bloqueo u obstrucción AON de unión de proteínas SR a dichos sitios ESE que posteriormente lleva a salto eficaz del exón así dirigido.

Bloquear u obstruir un sitio ESE se puede conseguir de varias maneras.

55

Por ejemplo, la hibridación de dicho AON puede alterar la estructura secundaria del exón, de manera que las proteínas SR ya no pueden enlazar con dicho sitio ESE.

En una forma de realización preferida, dicho AON solapa al menos parte de un sitio ESE predicho en el exón dirigido.

60

De esta manera, la unión de proteínas SR a dicho sitio se bloquea estéricamente por la hibridación de dicho AON a este.

Se prefiere que dicho AON superponga al menos un sitio ESE predicho.

Ya que los sitios ESE predichos tienden al agrupamiento se prefiere que, dicho AON superponga al menos dos y, preferiblemente, al menos tres sitios ESE predichos en dicho exón.

65

Así en una forma de realización preferida, un sitio de hibridación de dicho primer AON en el ARN de dicho exón de distrofina 45 solapa al menos un sitio ESE predicho en dicho exón ARN.

Preferiblemente, dicho sitio de hibridación de dicho segundo AON en dicho exón de distrofina 45 ARN solapa al

menos un sitio ESE predicho en dicho exón ARN.

[0012] No se prefiere dirigir dicho primer y dicho segundo AON a un sitio ESE predicho único en dicho exón de distrofina 45 ARN.

5 Aunque este puede ser el caso, se prefiere que dicho primer AON dirija un ESE diferente a dicho segundo AON. Esto se puede conseguir de varias maneras.

Preferiblemente, se evita dirigir el mismo ESE, evitando un solapamiento significativo en los sitios de hibridación de dicho AON en dicho exón de distrofina 45 ARN.

10 Así, preferiblemente, un sitio de hibridación de dicho primer AON y un sitio de hibridación de dicho segundo AON muestra menos de un solapamiento de 5 nucleótidos consecutivos.

Más preferiblemente, dichos sitios tienen menos de 3 y más preferiblemente menos de 1 o ningún solapamiento.

Tal solapamiento se puede evitar fácilmente por selección del AON.

15 Ya que un AON de la invención tiene preferiblemente un sitio de hibridación lineal y continuo en dicho exón de distrofina 45 ARN, el recubrimiento se evita, preferiblemente, evitando la identidad de secuencia significativa en los AON usados.

En este aspecto, se prefiere que dicho primer y dicho segundo AON tengan una identidad de secuencia de menos de 5 nucleótidos consecutivos.

20 Preferiblemente, dicho primer y dicho segundo sitio de hibridación en dicho exón de distrofina 45 ARN tienen un solapamiento de menos de 3 de nucleótidos consecutivos, más preferiblemente, menos de 2 y, preferiblemente, menos de 1 nucleótido o ningún recubrimiento.

De forma similar, dicho primer y dicho segundo AON, preferiblemente, tienen una identidad de menos de 3 secuencias de nucleótidos consecutivos, más preferiblemente, menos de 2 y, preferiblemente, una identidad de menos de 1 secuencia de nucleótidos.

25 En una forma de realización preferida, dicho exón de distrofina 45 comprende al menos dos sitios ESE independientes.

Dicho primer AON está preferiblemente dirigido a al menos dos sitios ESE independientes y dicho segundo AON a un segundo de los mismos.

30 [0013] La calificación "identidad de secuencia" como se utiliza en este caso, preferiblemente, se refiere a la identidad utilizando los nucleótidos A, C, G o T, donde T se puede sustituir por un U. En los últimos años, se han generado muchos análogos de nucleótidos diferentes.

Algunos de estos tienen las mismas características de unión en tipo y cantidad que los nucleótidos clásicos o naturales mencionados.

35 Sin embargo, la mayor parte de estos imitan las mismas características de unión en el tipo pero no en la cantidad.

En muchos casos, la fuerza de unión de un análogo al nucleótido complementario es inferior a la del nucleótido tradicional correspondiente.

Hay también análogos que imitan las características de unión de dos o más de los nucleótidos tradicionales y hay también análogos de nucleótido que son incorporados eficazmente a un ácido nucleico pero que no exponen una selectividad significativa para o unión para un nucleótido clásico particular en la cadena opuesta.

40 Un experto en la técnica se familiariza con los particulares de estos y análogos similares, y puede usarlos en un AON de la invención, siempre y cuando AON sea capaz de la hibridación al sitio de hibridación en el exón ARN.

[0014] Un AON de la invención preferiblemente comprende entre 14-40 nucleótidos o sus análogos.

Preferiblemente, dicho AON comprende entre 14-25 nucleótidos o sus análogos.

45 Preferiblemente, un AON de la invención comprende menos del 10 % de análogos de nucleótido.

Preferiblemente, un AON comprende menos de los 4 análogos de nucleótido, preferiblemente, menos de 3, más preferiblemente, menos de 2.

[0015] Un AON de la invención es preferiblemente un oligonucleótido modificado.

50 En una forma de realización preferida, particularmente, dicho AON comprende uno o más 2'-O-metil oligoribonucleótidos, que hacen el AON resistente a la degradación inducida por la RNasa H de híbridos ADN/ARN.

Adicionalmente, un esqueleto de fosforotioato se puede utilizar para aumentar la estabilidad de los AON contra las nucleasas y para mejorar la absorción celular.

55 Un AON de la invención tiene, en una forma de realización preferida, un esqueleto de fosforotioato de longitud total y todas las bases (nucleótidos) tienen una modificación de 2'-O-metil.

Alternativamente, ADN de morfolino fosforodiamidada (morfolinos), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y los ácidos nucleicos oligos que comprenden etileno (ENA) se han usado para modular el empalme.

Por lo tanto, un AON de la presente invención puede también tener estas modificaciones.

60 Estas modificaciones hacen que la RNasa H oligos y nucleasa sean resistentes y aumentan la afinidad para el ARN diana.

Para la modificación ENA y LNA este aumento se acompaña por una especificidad de secuencia disminuida.

[0016] Una parte interna de exón de un exón es una parte que no expone el recubrimiento con un extremo 5'- o 3'-del exón.

65 Un extremo 5'- y 3'-de un exón contiene la información de secuencia que es pertinente para la región de unión del exón.

Una parte interna de exón del exón es al menos un y al menos dos y más preferiblemente al menos 5 nucleótidos internos al límite del exón.

Un AON interno de exón también puede tener, además de la parte interna de exón, tal y como se define arriba, nucleótidos que se extienden al límite del exón o más allá de este.

5 Sin embargo, este preferiblemente no es el caso.

[0017] Un primero y un segundo AON para uso según la invención o un método de la invención preferiblemente comprende además incluir dicho primer y dicho segundo AON en un conjunto de AON cuando la provisión de una célula con dicho segundo AON aumenta la eficiencia con la cual dicho exón de distrofina 45 se excluye de dicho ARNm de distrofina maduro en una célula que produce un precursor de dicho ARNm.

10 Preferiblemente, dicho conjunto se usa posteriormente para obtener un salto de exón en células diana que expresan dicho pre-ARNm.

La invención también proporciona un conjunto que comprende al menos dos AON donde al menos un primer de dicho AON puede hibridar una parte interna de exón de un exón y un segundo de dicho AON puede hibridar otra parte interna de exón de dicho exón.

15 En una forma de realización preferida de la invención, dicho conjunto se obtiene por un método de la invención.

Particularmente, en una forma de realización preferida, dicho primer y dicho segundo de dicho AON están dirigidos a sitios ESE en dicho exón ARN.

20 Más preferiblemente, dicho primer y dicho segundo de dicho AON están dirigidos a sitios independientes ESE en dicho exón ARN.

[0018] Un conjunto de la divulgación se puede usar en muchas vías.

En una forma de realización, dicho conjunto se utiliza para reducir al menos en parte la producción de una proteína aberrante en una célula.

25 Tales proteínas pueden por ejemplo ser onco-proteínas o proteínas virales.

En muchos tumores no solo la presencia de una onco-proteína, sino también su nivel relativo de expresión se han asociados al fenotipo de la célula tumoral.

De forma similar, no solo la presencia de proteínas virales, sino también la cantidad de proteína vírica en una célula determina la virulencia de un virus particular.

30 Además, para una multiplicación eficaz y extensión de un virus, la sincronización de expresión en el ciclo de vida y el equilibrio en la cantidad de determinadas proteínas víricas en una célula determina si los virus se han producido eficaz o ineficazmente.

Al utilizar un conjunto de la divulgación es posible disminuir la cantidad de proteína aberrante en una célula de manera que, por ejemplo, una célula tumoral se vuelve menos tumorigénica (metastásica) y/o una célula infectada viral produce menos virus.

35 En una forma de realización preferida, un conjunto de la divulgación se usa para convertir dicha proteína aberrante en una proteína funcional.

En una forma de realización, dicha proteína funcional es capaz de la realización de una función de una proteína normalmente presente en una célula pero ausente en las células que se van a tratar.

40 Muy a menudo, cada restauración parcial de función produce un rendimiento significativamente mejorado de la célula así tratada.

Debido al mejor rendimiento, tales células también pueden tener una ventaja selectiva sobre células no modificadas, de forma que ayudan a la eficacia del tratamiento.

45 Este aspecto de la divulgación es particularmente adecuado para la restauración de expresión de genes defectuosos.

Esto se consigue causando el salto específico de exones previstos, pasando así o corrigiendo mutaciones deletéreas (típicamente mutaciones de parada o mutaciones puntuales de desplazamiento del marco de lectura, deleciones uni- o multi-exón o inserciones que conducen a una interrupción de traslación).

50 [0019] En comparación con estrategias de introducción de gen, la terapia genética de salto de exón requiere la administración de reactivos terapéuticos mucho más pequeños, típicamente, pero no limitados a, AON que comprende o imita entre aproximadamente 14-40 nucleótidos.

En una forma de realización preferida, se usan AON de 14-25 nucleótidos, ya que estas moléculas son más fáciles de producir e introducir en la célula más eficazmente.

55 El conjunto de la divulgación permite más flexibilidad en el diseño posterior de estrategias de salto de exón eficaces y seguras y/o sistemas de administración.

Una ventaja adicional importante de un conjunto de restauración de función de gen de AON es que este restaura (al menos algo de) la actividad del gen endógeno, que todavía posee más o todo su circuito regulador de gen, de forma que asegura niveles de expresión apropiados y la síntesis de isoformas tisulares específicas.

60 [0020] Este aspecto de la divulgación puede en principio ser aplicado a cualquier enfermedad genética o predisposición genética a la enfermedad, donde el salto previsto de exones específicos restaura el marco de lectura traslacional cuando este ha sido interrumpido por la mutación original.

Esta aplicación es particularmente útil cuando la traslación de una proteína internamente ligeramente más corta o alterada es funcional completamente o parcialmente.

La presente descripción puede ser de valor terapéutico en: predisposición para las segundas mutaciones diana en

los genes de supresor tumoral, por ejemplo, aquellos implicados en el cáncer de mama, cáncer de colon, esclerosis tuberosa, neurofibromatosis, etc., donde la restauración (parcial) de actividad excluiría la manifestación de nulismia por las segundas mutaciones diana y así se protegerían frente a la tumorigénesis.

Otra forma de realización preferida implica la restauración (parcial) de productos genéticos defectuosos que tienen una enfermedad directa que causa el efecto de, por ejemplo, hemofilia A (coagulación de deficiencia de Factor VIII, algunas formas de hipotiroidismo congénito (debido a deficiencia de síntesis de tiroglobulina) y Distrofia Muscular de Duchenne (DMD), donde las delecciones de desplazamiento del marco de lectura, duplicaciones y mutaciones de parada en el gen de distrofina vinculada al cromosoma X provoca la degradación muscular severa progresiva.

DMD es letal típicamente en la adolescencia tardía o edad adulta temprana, mientras delecciones de no desplazamiento del marco de lectura o duplicaciones en el mismo gen provocan la distrofia muscular de Becker mucho más suave (BMD), compatible con una esperanza de vida entre 35-40 y lo normal.

En la forma de realización como se ha aplicado en DMD, la presente descripción permite que el salto de exón se extienda a una delección existente (o altere el producto ARNm de una duplicación existente) por tantos exones adyacentes como se requiera para devolver el marco de lectura y generar una proteína internamente ligeramente acortada, pero todavía funcional.

Basado en los síntomas clínicos mucho más suaves de pacientes BMD con el equivalente de esta delección inducida, la enfermedad en los pacientes DMD tendría un curso mucho más tranquilo después de la terapia AON.

Considerando los muchos usos clínicos de conjuntos de la divulgación, un método de la invención preferiblemente comprende además la provisión de dicho conjunto a una célula humana.

En una forma de realización, la invención proporciona un conjunto de AON obtenible por un método de la invención.

En una forma de realización preferida, dicho conjunto comprende al menos un AON representado por identidad de SEC nº 29, 30, 31, 32, 33, 34.

En otra forma de realización preferida, dicho conjunto de al menos dos AON comprende h45AON1 y h45AON4, h45AON1 y h45AON5, h45AON1 y h45AON9, h45AON2 y h45AON3, h45AON3 y h45AON4, h45AON3 y h45AON5, h45AON3 y h45AON9, h45AON4 y h45AON5, h45AON5 y h45AON9, según la reivindicación 11.

La presente descripción también proporciona un conjunto que comprende al menos AON de la tabla 1 y/o tabla 2.

La presente descripción proporciona un conjunto de al menos dos AON de la tabla 1 y/o la tabla 2 que comprende h2AON1 y h2AON3, h43AON1 y h43AON2, h43AON1 y h43AON3, h43AON1 y h43AON4, h43AON1 y h43AON5, h43AON2 y h43AON5, h43AON3 y h43AON5, h43AON4 y h43AON5, h45AON1 y h45AON4, h45AON1 y h45AON5, h45AON1 y h45AON9, h45AON2 y h45AON3, h45AON2 y h45AON4, h45AON2 y h45AON5, h45AON3 y h45AON4, h45AON3 y h45AON5, h45AON3 y h45AON9, h45AON4 y h45AON5, h45AON5 y h45AON9, h46AON4 y h46AON8, h46AON4 y h46AON20, h46AON4 y h46AON22, h46AON6 y h46AON21, h46AON8 y h46AON22, h46AON8 y h46AON23, h46AON8 y h46AON26, h46AON9 y h46AON21, h46AON9 y h46AON22, h46AON9 y h46AON26; h46AON22 y h46AON24; h46AON24 y h46AON26, h47AON1 y h47AON3, h47AON1 y h47AON5, h47AON2 y h47AON3, h47AON2 y h47AON5, h47AON3 y h47AON4, h47AON3 y h47AON5, h47AON3 y h47AON6, h47AON4 y h47AON5, h47AON5 y h47AON6, h48AON1 y h48AON4, h48AON1 y h48AON6, h48AON1 y h48AON8, h48AON1 y h48AON9, h48AON1 y h48AON10, h48AON2 y h48AON10, h48AON3 y h48AON4, h48AON4 y h48AON6, h48AON6 y h48AON8, h48AON6 y h48AON9, h48AON6 y h48AON10, h48AON7 y h48AON9, h57AON1 y h57AON3 y/o h57AON2 y h57AON3.

En una forma de realización preferida, dicho conjunto de al menos dos AON de la tabla 1 y/o la tabla 2 comprende h43AON1 y h43AON3, h45AON1 y h45AON4, h45AON1 y h45AON5, h45AON1 y h45AON9, h45AON2 y h45AON3, h45AON2 y h45AON4, h45AON3 y h45AON4, h45AON3 y h45AON5, h45AON3 y h45AON9, h45AON4 y h45AON5, h45AON5 y h45AON9, h46AON9 y h46AON21, h47AON1 y h47AON3, h47AON1 y h47AON5, h47AON2 y h47AON3, h47AON2 y h47AON5, h47AON3 y h47AON4, h47AON3 y h47AON5, h47AON3 y h47AON6, h47AON4 y h47AON5, h47AON5 y h47AON6, h48AON1 y h48AON4, h48AON1 y h48AON8, h48AON3 y h48AON4, h57AON1 y h57AON3, h57AON2 y h57AON3.

En una forma de realización preferida, particularmente, dicho conjunto de al menos dos AON de la tabla 1 y/o la tabla 2 comprende h45AON1 y h45AON4, h45AON1 y h45AON5, h45AON1 y h45AON9, h45AON2 y h45AON3, h45AON3 y h45AON4, h45AON3 y h45AON5, h45AON3 y h45AON9, h45AON4 y h45AON5, h45AON5 y h45AON9, h47AON1 y h47AON3, h47AON1 y h47AON5, h47AON2 y h47AON3, h47AON2 y h47AON5, h47AON3 y h47AON4, h47AON3 y h47AON5, h47AON3 y h47AON6, h47AON4 y h47AON5, h47AON5 y h47AON6, h48AON1 y h48AON4, h48AON1 y h48AON8, h48AON3 y h48AON4, h57AON1 y h57AON3, h57AON2 y h57AON3.

La presente descripción proporciona además un AON de la tabla 2.

Preferiblemente, dicho AON de la tabla 2 es h33AON1, h33AON2, h44AON3, h44AON4; h45AON11 o h52AON3.

[0021] En un aspecto, la divulgación proporciona además un método para el tratamiento del padecimiento de un individuo de un tumor, una infección viral y o una enfermedad genética y/o una predisposición genética, que comprende administrar un conjunto de AON de la divulgación a dicho individuo.

La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende un conjunto de AON, según la invención.

Preferiblemente, dicho conjunto se usa para el tratamiento del padecimiento de un individuo de un tumor, una infección viral y o una enfermedad genética y/o predisposición genética.

Preferiblemente, dicho conjunto se usa para el tratamiento de Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

[0022] La invención también proporciona una célula que produce un precursor que contiene un exón de una distrofina ARNm, donde dicha célula comprende un primer AON que puede hibridar una parte interna de exón de

dicho exón y un segundo AON que puede hibridar otra parte interna de exón de dicho exón y donde el exón de distrofina es el exón 45.

### Ejemplos

- 5 Exón de distrofina 45 de la invención y otros exones de distrofina de la divulgación. Resultados y exposición
- Doble diana dentro de un exón
- 10 [0023] Supusimos que dirigiendo los ESE múltiples diana dentro de un exón, las eficiencias de salto se pueden aumentar para exones que no se podrían saltar a altos niveles usando AON individuales. Las ubicaciones relativas de los AON para ESE putativos (como se ha predicho por ESEfinder) se representan para cada uno de estos exones en la Fig. 1A.
- 15 [0024] Primero evaluamos la doble diana de 2 exones insaltables (exón 47 y 57). Cuando los cultivos de miotubo de control humano fueron tratados con combinaciones diferentes de estos AON, se podrían haber conseguido niveles significativos de salto de exón 47 y 57 como se determinó con el análisis RT-PCR (Figs. 1BC, tabla suplementaria 1). De manera interesante, para el exón 47 solo combinaciones de no solapamiento de AON indujeron al salto de exón, mientras aquellos que hacen el solapamiento fueron inefectivos (tabla suplementaria 1). De forma similar, para el exón 57, la combinación de AON que casi se solapa (h57AON1 y 2) no indujo a un salto de exón. Esto encaja con nuestra hipótesis de que dos sitios ESE mutuamente excluyentes están presentes en estos exones.
- 25 [0025] Tanto para el exón 2 como para el exón 45 solo un AON único reproductivamente indujo bajos niveles de salto de exón (h2AON1 y h45AON5, respectivamente). Niveles considerablemente-superiores de salto de exón 45 podrían ser inducidos por la combinación del AON efectivo h45AON5 con inefectivos, al igual que por la combinación de dos AON inefectivos individualmente (por ejemplo, h45AON3 y h45AON9) (Fig. 1D).
- 30 Así para este exón, es posible que dos ESE eficaces también estén presentes. En cambio, las combinaciones de AON no aumentaron las eficiencias de salto para el exón 2. De hecho, combinando el efectivo h2AON1 con el inefectivo h2AON2 se abolió el salto de exón 2 (Fig. 1E). Esta interferencia no se observó para una combinación de h2AON1 con h2AON3 (que solapa menos de h2AON2). Para exones 43 y 48, los niveles eficaces de AON indujeron solo niveles moderados del salto.
- 35 Para estos exones, los niveles de salto podrían no ser aumentados usando combinaciones de AON (tabla suplementaria 1). En estos exones, pueden estar presentes tres o incluso más ESE. Por lo tanto, dirigimos el exón 48 con una combinación de 3 AON diferentes, que todavía no mejoraron niveles de salto.
- 40 Así, parece más posible que el empalme de este exón sea en gran medida independiente de sitios ESE. Este se soporta por el hecho de que los sitios de empalme predichos son perfectos (3' sitio de empalme) o casi perfectos (5' sitio de empalme) y que solo unos pocos ESE son predichos para el exón 48.
- 45 [0026] Finalmente, usamos combinaciones de exón 46 AON específicos, algunos de los cuales fueron ya muy eficaces individualmente. Intentamos aumentar niveles de salto a (cerca de) 100 %. Sin embargo, ninguna de las combinaciones usaron otros niveles de salto mejorados cuando se comparan con la simple diana (tabla suplementaria 1). Esto indica que el bloqueo de un sitio ESE es suficiente para perturbar el empalme correcto de este exón.
- 50 Es posible que los sitios ESE de este exón sean dependientes unos de otros, de modo que por el bloqueo de uno, más o todos los ESE son inactivados. Alternativamente, la estructura secundaria del pre-ARNm se puede cambiar al unir AON, de modo que los otros sitios ESE ya no están disponibles para la unión de proteínas SR.
- 55 [0027] De manera interesante, una vez más (parcialmente) combinaciones de solapamiento parecían interferir negativamente con las capacidades de salto de exón individuales, con independencia de si los AON únicos fueron efectivos o inefectivos. Estaba previsto que combinaciones de dos AON inefectivos de solapamiento también serían inefectivas, ya que ambos o dirigen el sitio ESE no funcional o dirigen los mismos de dos (o más) sitios ESE mutuamente excluyentes.
- 60 Para combinaciones AON eficaces de solapamiento, este hallazgo fue inesperado. Es posible, sin embargo, que estos AON concurren entre sí y se fuerzan el uno al otro a separar desde la transcripción diana en un proceso dinámico, de forma que se hace el sitio diana disponible nuevamente para proteínas SR.
- 65 Tras unir las proteínas SR reclutarán otros factores de empalme a los sitios de empalme y así mejoran la inclusión de exón antes que el salto de exón.

Materiales y métodos

AON y cebadores

- 5 [0028] Todos los AON usados para los experimentos de doble diana fueron previamente descritos (ver tabla suplementaria 1) ((11, 14, 15).  
Todos los AON contienen 2-O-metil ARN, columna vertebral de fosforotioato y 5' etiquetas de fluoresceína y fueron fabricados por Eurogentec (Bélgica). (RT-) cebadores de la PCR fueron elegidos en exones que flanquean los exones saltados (Eurogentec, Bélgica; secuencias disponibles bajo petición).
- 10 Cultivo de tejido, transfección y análisis RT-PCR
- [0029] El control y cultivos miotubo derivados de paciente DMD fueron obtenidos como se describe previamente (9, 22).
- 15 Para los experimentos de salto de exón, se realizaron transfecciones al menos dos veces con 200 nM de cada AON. En todos los experimentos se usó polietilenimina (PEI, ExGen 500, MBI Fermentas) según las instrucciones del fabricante, con 2 a 3,5 µl PEI por µg AON. Dependiendo del número de AON eficaces disponibles para cada uno de los exones diana, se evaluaron combinaciones diferentes de AON (tabla suplementaria 1).
- 20 Las soluciones separadas de complejos AON PEI fueron preparadas para cada AON. Los rendimientos de transfección se basaron generalmente sobre 80 % en la presencia de señales fluorescentes nucleares. ARN fue aislado 24-48 horas después de que se realizara la transfección y el análisis RT-PCR, como se describe previamente (14).
- 25 La transfección exitosa de cada AON fue confirmada por análisis RT-PCR con cebadores en los exones que flanquean el exón(es) diana. Fragmentos de la PCR fueron aislados desde el gel de agarosa y el análisis de secuenciación se realizó como se describe previamente (10).





H45AON2 <sup>7</sup>	uuuuucugucugacagcug	45	-	3,03	0,82	2,07	0,93	154	5	19	0,74	42 %
H45AON3	ucuguuuuuugagauugc	45	-	0,37	1,82	1,97	1,85	75	85	18	0,39	39 %
H45AON4	ccaccgcagauucaggc	45	-	3,27	1,45	1,81	3,39	122	39	17	0,47	65 %
H45AON5 <sup>8</sup>	gccccauugccauccugg	45	+	0,50	2,30	1,19	0,35	6	155	17	0,29	65 %
H45AON9 <sup>8</sup>	uuugcagaccuccgccc	45	-	3,96	3,20	0,86	2,56	137	24	17	0,65	59 %
H46AON4 <sup>6</sup>	cuguuuccuccaacc	46	+	2,34	2,82	1,68	0,01	63	72	15	0,07	60 %
H46AON6 <sup>6</sup>	guuuucugucucccaacc	46	+	2,34	2,82	1,68	2,46	63	67	20	0,15	50 %
H46AON8 <sup>6</sup>	guuuucuuuuuagucguc	46	++	-1,14	1,08	3,52	1,04	115	15	20	0,60	40 %
H46AON9 <sup>6</sup>	uuaguugcugcucu	46	-	0,66	1,30	0,51	2,83	111	24	15	1,00	40 %
H46AON20	gaaauucugacaagaauuuc	46	+	1,35	1,08	2,07	1,48	15	114	21	0,48	29 %
H46AON21	uaaaacaauucuu	46	-	-2,28	-0,40	-0,72	0,83	47	88	15	0,40	13 %
H46AON22	uccagguucaagugggauac	46	++	2,39	3,47	3,70	0,78	90	40	20	0,60	50 %
H46AON23	uuccagguucaagug	46	++	1,61	1,03	1,47	0,78	96	39	15	0,53	47 %
H46AON24	ucaagcuuuuuuuuag	46	+	-1,19	-1,09	3,52	0,18	122	11	17	0,35	29 %
H46AON25	cugacaagaauuucuu	46	+	-0,80	1,08	0,74	1,48	14	120	16	0,88	31 %
H46AON26	agguucaaguggauacua	46	++	2,39	3,47	3,70	2,09	88	43	19	0,79	42 %
H47AON1 <sup>7</sup>	ucuuugcucuuucuggcucu	47	-	3,82	1,55	3,68	1,21	87	47	18	0,22	50 %
H47AON2 <sup>7</sup>	uuugagcuuuuuucaaguuu	47	-	-0,89	2,17	2,20	0,53	101	30	21	0,48	29 %
H47AON3	uccaguuucauuuuuuguuug	47	-	1,70	0,22	2,76	1,02	39	91	22	0,45	27 %
H47AON4	cugcuugagcuuuuuucaaguu	47	-	0,74	2,17	2,20	0,53	103	26	23	0,39	35 %
H47AON5	agcucuuaacaagcagcgggu	47	-	-1,37	2,05	1,25	2,07	63	70	19	0,53	53 %
H47AON6	uucaaguuuuuucugcucuuc	47	-	1,11	0,96	0,74	-0,40	94	37	21	0,33	33 %
H48AON1 <sup>7</sup>	uuucuccuuuuuucuc	48	-	0,83	0,08	2,44	1,38	19	153	16	0,81	38 %
H48AON2 <sup>7</sup>	uuuuuuuuuuuccaagucguc	48	-	0,64	1,50	2,33	1,31	133	34	21	0,48	24 %
H48AON3	ggcuuuuuuuuuugagcucu	48	-	1,72	1,72	2,83	1,58	37	132	19	0,74	37 %
H48AON4	cuucaagcuuuuuucaagcu	48	-	-1,34	1,32	2,32	0,42	62	105	21	0,62	33 %
H48AON6	gcuucauuuuuccuuguu	48	+	0,83	0,34	1,62	2,57	23	146	19	0,63	37 %
H48AON7	uuuuuuuuuuuuuagcuuuuu	48	+	0,01	1,72	1,62	2,57	32	137	19	0,68	21 %
H48AON8	gcuuuuuuuuuuuuuuuuuuu	48	-	0,91	1,96	0,25	1,90	48	123	17	0,53	53 %
H48AON9	cuucaagguuuucaagcuuuu	48	+	0,91	1,96	2,32	2,21	71	96	21	0,62	38 %
H48AON10	uaacugcucuuaaagguucuc	48	+	0,91	1,96	2,32	2,21	79	88	21	0,48	43 %
H49AON1 <sup>7</sup>	cuuccacaucgguuuuuuuu	49	++	3,02	0,52	1,96	3,41	25	60	19	0,42	47 %
H49AON2 <sup>7</sup>	guggcuguuuuuuuccuugu	49	++	0,56	0,05	0,70	1,38	60	25	19	0,32	47 %
H50AON1 <sup>7</sup>	cucagagcucagauuuu	50	++	1,69	3,02	2,71	-0,03	11	83	17	0,24	47 %
H50AON2 <sup>7</sup>	ggcugcuuuugccccc	50	+	1,10	1,37	1,41	2,83	60	36	15	0,47	67 %
H51AON1 <sup>7</sup>	ucaaggaagaugggcauuuu	51	++	-0,31	1,48	1,35	0,41	68	147	20	0,70	40 %
H51AON24	gaaagccagucgguaaguu	51	-	1,77	1,14	4,90	2,04	132	83	20	0,80	50 %
H51AON27	caccaccacacccc	51	-	0,39	1,74	0,38	1,31	181	39	15	0,00	67 %
H51AON2 <sup>7</sup>	ccucuguguuuuuuuaaacuugau	51	++	2,68	2,27	3,94	2,91	160	52	23	0,22	30 %
H51AON29	ugauuuuccucaagguuacccc	51	++	1,67	1,91	2,88	2,82	191	24	20	0,25	50 %

H52AON1	uugcugucuuuuuuuuc	52	+	1,56	3,61	2,44	0,52	69	33	18	0,50	39 %
H52AON2	ccguaaugauuuuuu	52	-	-0,07	1,11	2,28	-0,80	97	7	16	0,25	38 %
H53AON1 <sup>7</sup>	cugugccuccgguucug	53	+	3,08	2,26	1,63	0,77	45	151	18	0,78	61 %
H53AON2 <sup>7</sup>	uugcucugccuguccu	53	-	2,20	4,04	3,40	0,21	128	68	18	0,50	61 %
H54AON1	uacauuugucugccacugg	54	++	3,77	1,64	4,00	1,88	21	118	18	0,56	50 %
H54AON2	cccggagaaguuuca999	54	++	3,14	1,80	3,54	1,34	58	80	19	0,58	58 %
H55AON1	cugugcaguaucuaugag	55	+	0,74	4,82	4,92	2,92	33	139	20	0,65	40 %
H55AON2	ugccauuuuucaucagcucuuu	55	+	2,70	2,29	3,46	1,27	167	2	23	0,52	39 %
H55AON3	ugcaguaucuaugaguuc	55	+	0,74	4,82	4,92	2,41	29	143	20	0,60	35 %
H55AON5	uccugaggacauuggcagu	55	++	3,03	2,67	5,66	2,34	104	68	20	0,35	50 %
H55AON6	gagucuucaaggagccuu	55	++	0,87	5,77	3,36	0,33	139	35	18	0,28	50 %
H56AON1	uuuuuggcuguuuucacuc	56	+	2,77	1,56	2,52	2,22	48	107	20	0,55	35 %
H56AON2	guucacuccacugaaguuc	56	-	0,78	1,88	4,04	1,52	129	26	20	0,35	45 %
H56AON3	ccuucagggaucucag9	56	+	1,81	5,52	3,68	0,27	69	88	18	0,56	61 %
H57AON1	uaggugcugccggcuu	57	-	2,11	3,30	2,54	2,03	97	45	17	0,41	65 %
H57AON2	cugaacugcugaagucgcc	57	-	2,47	1,95	2,77	2,41	118	20	21	0,57	57 %
H57AON3	uucagcuga9ccacacc	57	-	2,83	4,73	4,81	4,10	64	77	18	0,28	56 %
H58AON1	uuuuuaguuuucauuuccuc	58	-	0,63	1,70	2,52	1,60	9	92	22	0,64	32 %
H58AON2	gaguuuucua9ucuuucc	58	+	1,65	3,45	2,18	0,68	86	18	19	0,37	47 %
H59AON1	cauuuuuuccacucaguuu	59	-	1,77	0,34	3,53	2,23	66	184	21	0,57	33 %
H59AON2	uuagaauuuccugagucuu	59	++	1,31	4,84	3,26	1,34	134	118	19	0,47	42 %
H60AON1	guucuuuucagaggcc	60	+	0,66	3,66	2,29	3,00	19	112	18	0,56	56 %
H60AON2	gugcugaguuuauccggug	60	-	2,87	2,56	4,08	2,78	92	38	19	0,84	53 %
H61AON1	gucccu9uggcuucaug	61	-	5,26	2,92	5,97	2,57	31	31	19	0,37	58 %
H61AON2	gugcugagau9cuggacc	61	+	2,28	3,32	4,43	3,64	51	12	18	0,56	61 %
H62AON1	uggcucucucccagg9	62	++	1,08	0,33	1,89	-0,50	15	32	16	0,50	69 %
H62AON2	999cacuuuuuu99cg	62	-	1,70	0,56	1,71	0,09	37	9	17	0,47	59 %
H63AON1	9guccagcaaguuuuug	63	+	1,70	0,97	3,16	1,25	11	34	19	0,79	53 %
H63AON2	guagagcucugcauuu999	63	+	2,81	2,57	3,12	0,93	33	10	21	0,38	48 %
H71AON1	gccagaagu9uacagagau	71	++	0,12	3,35	4,36	1,47	8	14	19	0,79	47 %
H71AON2	ucuacugccagaaguug	71	++	1,37	4,61	4,36	1,47	16	7	18	0,50	50 %
H72AON1	ugaguaucucgugugaaag	72	++	6,59	0,60	6,02	0,25	20	28	20	0,60	40 %
H72AON2	gcauauguucau9cug9	72	+	0,77	2,43	1,26	2,14	42	7	19	0,47	42 %
H73AON1	gauccau9cuguuuucc	73	++	1,22	0,89	2,16	2,47	13	37	18	0,39	44 %
H73AON2	gagau9cuaucuuuagaua	73	+	-0,48	0,68	2,28	3,64	31	16	21	0,29	29 %
H74AON1	cuggcucag9999gagu	74	++	1,35	2,39	2,35	1,39	51	93	17	0,59	71 %
H74AON2	uccccuuuuuccucacucu	74	+	3,04	0,33	1,68	2,82	72	70	19	0,16	53 %

H75AON1	ccuuuauuguucgugcugcu	75	++	3,64	1,41	3,39	2,83	33	194	19	0,21	47 %
H75AON2	ggcggccuuuguguugac	75	++	1,51	1,11	3,71	1,12	144	84	18	0,39	61 %
H76AON1	gagagguaagaaggagagga	76	-	0,08	1,28	3,53	3,22	37	70	19	0,32	53 %
H76AON2	auaggcugacugcugcgg	76	+	3,23	1,47	4,30	1,58	65	42	19	0,32	58 %
H77AON1	Uuguguccuggggagga	77	++	4,26	3,50	3,57	-0,18	20	58	17	0,47	59 %
H77AON2	Ugcuccaucaccuccucu	77	++	2,43	0,32	-0,21	1,65	47	30	18	0,39	56 %
H78AON1	Gcuuuccagggguuuuc	78	++	1,81	4,04	3,32	0,62	4	12	18	0,78	50 %
H78AON2	Cauuggcuuuccagggg	78	++	1,81	2,95	3,32	0,27	10	7	17	0,71	59 %

<sup>1</sup> ++ Salto de exón observado en sobre 25 % de transcritos en los cultivos de miotubo de control normales; + salto de exón observado en hasta 25 % de transcritos; - ningún salto de exón detectado

<sup>2</sup> Por cada AON el valor de máximo se da para cada una de las proteínas SR

<sup>3</sup> Número de nucleótidos entre los AON y los sitios de empalme 5' y 3' (SS) en nucleótidos.

<sup>4</sup> La distancia a los sitios de empalme 3' y 5' se determina del primer (sitio de empalme 3') o último (sitio de empalme 5') nucleótido en la secuencia diana

<sup>5</sup> Este AON dirige parte del ESE eliminado en la delección Kobe (Matsuo et al., 1990; Matsuo et al., 1991)

<sup>6</sup> Previamente publicado (van Deutekom et al., 2001)

<sup>7</sup> Previamente publicado (Aartsma-Rus et al., 2002)

<sup>8</sup> Previamente publicado (van Deutekom et al., 2001; Aartsma-Rus et al., 2003; Aartsma-Rus et al., 2004)

# ES 2 614 980 T3

Tabla 2

Nombre AON	Exón de distrofina humana diana	Secuencia	Eficaz
H33AON1	33	cugacguccagucuuuauuc	Sí
H33AON2	33	gggauuuuccgucugcuu	Sí
H44AON3	44	ccgccauuucucaacag	Sí
H44AON4	44	uucucaggaauuugugucuuu	Sí
H45AON10	45	caguuugccgugccca	No
H45AON11	45	guugcauucuauguucugac	Sí
H45AON12	45	auuuuuccuguagaauacugg	No
H52AON3	52	gcuggucuuuuuuuca	Sí
H52AON4	52	uggucuuuuuucauuuu	No
H52AON5	52	gucuuuuuucauuuuug	No
H52AON6	52	cuuuuuuucauuuuuggg	No
H52AON7	52	uuuuuucauuuuugggc	No
H64AON1	64	uccuauaagcugagaucug	No
H64AON2	64	gccuucugcagucucgg	No

Tabla suplementaria 1. Vista de los AON usados y resultados obtenidos de los experimentos de doble diana

Exón diana	AON	Resultado <sub>1</sub>	Combinado con (Resultado) <sup>2</sup>															
2	h2AON1	+	AON2 (-)	AON3 (=)														
	h2AON2	-		AON3 (-)														
	h2AON3	-																
43	h43AON1	-	AON2 (=)	AON4 (=)	AON5 (=)													
	h43AON2	+			AON5 (=)													
	h43AON3	-			AON5 (=)													
	h43AON4	-			AON5 (=)													
	h43AON5	+			AON5 (=)													
45	h45AON1	-	AON2 (-)	AON4 (+)	AON5 (+)	AON9 (+)												
	h45AON2	-		AON3 (+)	AON5 (=)	AON9 (-)												
	h45AON3	-		AON4 (+)	AON5 (+)	AON9 (+)												
	h45AON4	-			AON5 (+)													
	h45AON5	-			AON5 (+)													
	h45AON9	+				AON9 (+)												
	h46AON4	+	AON6 (-)	AON8 (=)	AON20 (=)	AON21 (-)	AON22 (=)	AON24 (-)	AON25 (-)									
h46AON6	+				AON21 (=)													
h46AON8	+				AON21 (+)	AON22 (=)	AON23 (-)	AON26 (=)										
h46AON9	-					AON22 (=)	AON23 (-)											
h46AON2 <sub>0</sub>	+																	
h46AON2 <sub>1</sub>	-																	
h46AON2 <sub>2</sub>	+																	
h46AON2 <sub>3</sub>	+																	

h46AON2 4	+																				AON26 (=)	
h46AON2 5	+																					
h46AON2 6	+																					
47																						
h47AON1	-	AON2 (-)	AON3 (+) AON3 (+)	AON4 (-)	AON5 (+) AON5 (+) AON5 (+) AON5 (+)	AON6 (+) AON6 (+)																
h47AON2	-																					
h47AON3	-			AON4 (+)																		
h47AON4	-																					
h47AON5	-																					
h47AON6	-																					
48																						
h48AON1	-	AON2 (-)	AON3 (-) AON3 (-)	AON4 (+) AON4 (+)	AON6 (=) AON6 (-)	AON7 (-) AON7 (-)	AON8 (+) AON8 (-)	AON9 (=) AON9 (=)	AON10 (=) AON10 (=)													
h48AON2	-																					
h48AON3	-			AON4 (+)																		
h48AON4	-																					
h48AON6	-																					
h48AON7	+																					
h48AON8	-																					
h48AON9	+																					
h48AON1 0	+																					
57																						
h57AON1	-	AON2 (-)	AON3 (+) AON3 (+)																			
h57AON2	-																					
h57AON3	-																					

“+” salto de exón observado para este AON individual, “-” salto de exón no observado (reproductivamente) para este AON individual  
²Resultados de la doble diana comparados con la simple diana “+” doble diana es más eficiente que la diana con cualquiera de los AON individuales, “=”  
eficiencia de doble diana comparada con el simple AON más eficiente, “-” doble diana no efectiva o menos eficiente el simple AON más eficiente.  
Los AON efectivos están sombreados de gris claro, combinaciones que funcionan notablemente mejor que el sompie AON más efectivo están  
sombreadas en gris oscuro, las combinaciones que se solapan están subrayadas.



## Breve descripción de los dibujos

[0030] Figura 1. Doble diana (A). Ubicaciones relativas de AON y sitios ESE putativos dentro de exones 2, 43, 45-48 y 57.

5 Los exones y AON se extraen para escalar como líneas para cada exón. Los sitios de unión putativos de SF2/ASF, SC35; SRp40 y SRp55 como se ha predicho por ESEfinder se representan como cajas a sus ubicaciones respectivas. (B-E). Algunos ejemplos del análisis RT-PCR después de experimentos de doble diana. (BC). Para los exones 47 y 57 ninguno de los AON disponibles reproductivamente indujeron el salto de exón.

10 Sin embargo, utilizando combinaciones de estos AON, el salto de exón 47 y 57 fue inducido reproductivamente a niveles significativos.

Para combinaciones de exón 57 que contienen h57AON3 fueron más eficaces, mientras para el exón 47 todas las combinaciones de no solapamiento indujeron niveles comparables de salto de exón 47.

15 En algunos casos, una banda adicional podría ser observada en el exón 47 PCR, que fue ligeramente más corto que el producto tipo salvaje.

Esta banda no era reproducible, fue observada en muestras tratadas y no tratadas, y parecía ser un producto PRC específico que contiene exones DMD 72-74. (D).

20 Para el exón 45 solo uno de los AON disponibles indujeron reproductivamente el salto, sin embargo a niveles bajos (h45AON5).

Niveles muy bajos de salto de exón fueron ocasionalmente observados para h45AON1 y h45AON4, pero este no era reproducible.

El salto de exón 45 podría conseguirse a niveles mucho más altos usando combinaciones de AON.

Los niveles máximos de salto de exón 45 fueron observados para combinaciones de h45AON5 y h45AON1 o h45AON3 y para h45AON1 y h45AON9.

25 En cambio, una mezcla del solapamiento h45AON2 y h45AON9 fue inefectiva. (E).

Para el exón 2 solo el solapamiento AON estaba disponible.

Cuando el h2AON1 efectivo se combinó con el, inefectivo, de solapamiento h2AON2, ningún salto podría ser inducido.

Este efecto no se vio cuando h2AON1 se combinó con el inefectivo, de menos solapamiento h2AON3.

30 La secuencia del AON mencionado se da en el artículo Aartsma-Rus A, et al. (2005).

El análisis funcional de AON de exón interno 114 para salto de exón DMD diana: indicación para el impedimento estérico de sitios de unión de proteínas SR.

Oligonucleótidos 15: 284-297.

NT no es transfectado, -RT es control negativo, M es marcador de tamaño 100 bp.

35

## Bibliografía citada

[0031]

- 40 1. Emery AE. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet* 359: 687-95.  
 2. Monaco AP, Bertelson CJ, Liechti-Gallati S, Moser H, and Kunkel LM. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2: 90-95.  
 3. Hoffman EP, et al. (1988). Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 318: 1363-1368.  
 45 4. Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ, Monaco AP, Feener C, and Kunkel LM. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50: 509-517.  
 5. Yoshida M, and Ozawa E. (1990). Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J Biochem (Tokyo)* 108: 748-752.  
 50 6. Hoffman EP, Brown RH, Jr., and Kunkel LM. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919-928.  
 7. Lu QL, et al. (2003). Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat Med* 8: 1009-1014.  
 8. van Deutekom JC, and van Ommen GJ. (2003). Advances in Duchenne muscular dystrophy gene therapy. *Nat Rev Genet* 4: 774-783.  
 55 9. Aartsma-Rus A, et al. (2003). Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet* 12: 907-914.  
 10. van Deutekom JC, et al. (2001). Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum Mol Genet* 10: 1547-1554.  
 60 11. Aartsma-Rus A, et al. (2004). Antisense-induced multiexon skipping for duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 74: 83-92.  
 12. Bremmer-Bout M, et al. (2004). Targeted Exon Skipping in Transgenic hDMD Mice: a Model for Direct Pre-clinical Screening of Human-specific Antisense Oligonucleotides. *Molecular Therapy* 10: 232-240.  
 13. Lu QL, et al. (2005). Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102: 198-203.  
 65 14. Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson A, Den Dunnen J, van Ommen G, and van Deutekom J. (2002).

Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord* 12: S71-S77.

15. Aartsma-Rus A, et al. (2005). Functional analysis of 114 exon-internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 15: 284-297.

5 16. Stojdl DF, and Bell JC. (1999). SR protein kinases: the splice of life. *Biochem Cell Biol* 77: 293-298.

17. Fokkema IF, den Dunnen JT, and Taschner PE. (2005). LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Hum. Mutat.* 26: 63-68.

18. England SB, et al. (1990). Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343: 180-182.

10 19. Mirabella M, et al. (1998). Giant dystrophin deletion associated with congenital cataract and mild muscular dystrophy. *Neurology* 51: 592-595.

20. Bushby KM, Appleton R, Anderson LV, Welch JL, Kelly P, and Gardner-Medwin D. (1995). Deletion status and intellectual impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol* 37: 260-269.

15 21. Tennyson CN, Klamut HJ, and Worton RG. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet* 9: 184-190.

22. Havenga MJ, et al. (2002). Exploiting the natural diversity in adenovirus tropism for therapy and prevention of disease. *J Virol* 76: 4612-4620.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Primer oligonucleótido antisentido (AON) que puede hibridar una parte interna de exón de un exón a partir de un precursor del ARNm de distrofina y un segundo AON que puede hibridar otra parte interna de exón de dicho exón para usar en el tratamiento DMD, donde la eficiencia con la cual dicho exón es excluido de un ARNm maduro se aumenta proporcionando dicho segundo AON, donde dicho exón de distrofina es el exón 45.
- 10 2. Método in vitro para la determinación de si se puede aumentar la eficiencia con la cual un exón de distrofina es excluido de un ARNm de distrofina maduro en una célula que produce un precursor que contiene un exón de dicho ARNm dicho método comprende proporcionar dicha célula con un primer oligonucleótido antisentido (AON) que puede hibridar una parte interna de exón de dicho exón y determinar si dicha eficiencia se aumenta al proporcionar un segundo AON a dicha célula con que puede hibridar otra parte interna de exón de dicho exón, donde dicho exón de distrofina es el exón 45.
- 15 3. Primero y un segundo AON para uso, según la reivindicación 1, o un método según la reivindicación 2, donde un sitio de hibridación de dicho primer AON y un sitio de hibridación de dicho segundo AON muestran un solapamiento de menos de 5 nucleótidos.
- 20 4. Primero y segundo AON para uso, según la reivindicación 1 o 3, o un método según la reivindicación 2 o 3, donde un sitio de hibridación de dicho primer AON en el ARN de dicho exón solapa un sitio intensificador de empalme exónico predicho (ESE) en dicho ARN de exón.
- 25 5. Primero y segundo AON para uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 o 4, o un método según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde un sitio de hibridación de dicho segundo AON en el ARN de dicho exón solapa un sitio ESE predicho en dicho ARN de exón.
- 30 6. Primero y segundo AON para uso, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3-5, o un método según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, donde dicho exón comprende al menos dos sitios ESE independientes.
- 35 7. Primero y segundo AON para uso, según la reivindicación 6, o un método según la reivindicación 6, que comprende además la provisión de dicho conjunto a una célula humana.
8. Conjunto de AON obtenible por un método, según la reivindicación 2.
- 40 9. Conjunto de AON, según la reivindicación 8, que comprende al menos un AON representado por SEC ID n.º: 29, 30, 31, 32, 33, 34.
- 45 10. Conjunto de AON, según la reivindicación 9, que comprende:  
SEC ID n.º: 29 y 32,  
SEC ID n.º: 29 y 33,  
SEC ID n.º: 29 y 34,  
SEC ID n.º: 30 y 31,  
SEC ID n.º: 31 y 32,  
SEC ID n.º: 31 y 33,  
SEC ID n.º: 31 y 34,  
SEC ID n.º: 32 y 33 o SEC ID n.º:33 y 34.
- 50 11. AON representado por SEC ID n.º: 120.
12. Célula que produce un precursor que contiene un exón de un ARNm de distrofina, donde dicha célula comprende un primer AON que puede hibridar una parte interna de exón de dicho exón y un segundo AON que puede hibridar otra parte interna de exón de dicho exón y donde el exón de distrofina es el exón 45.

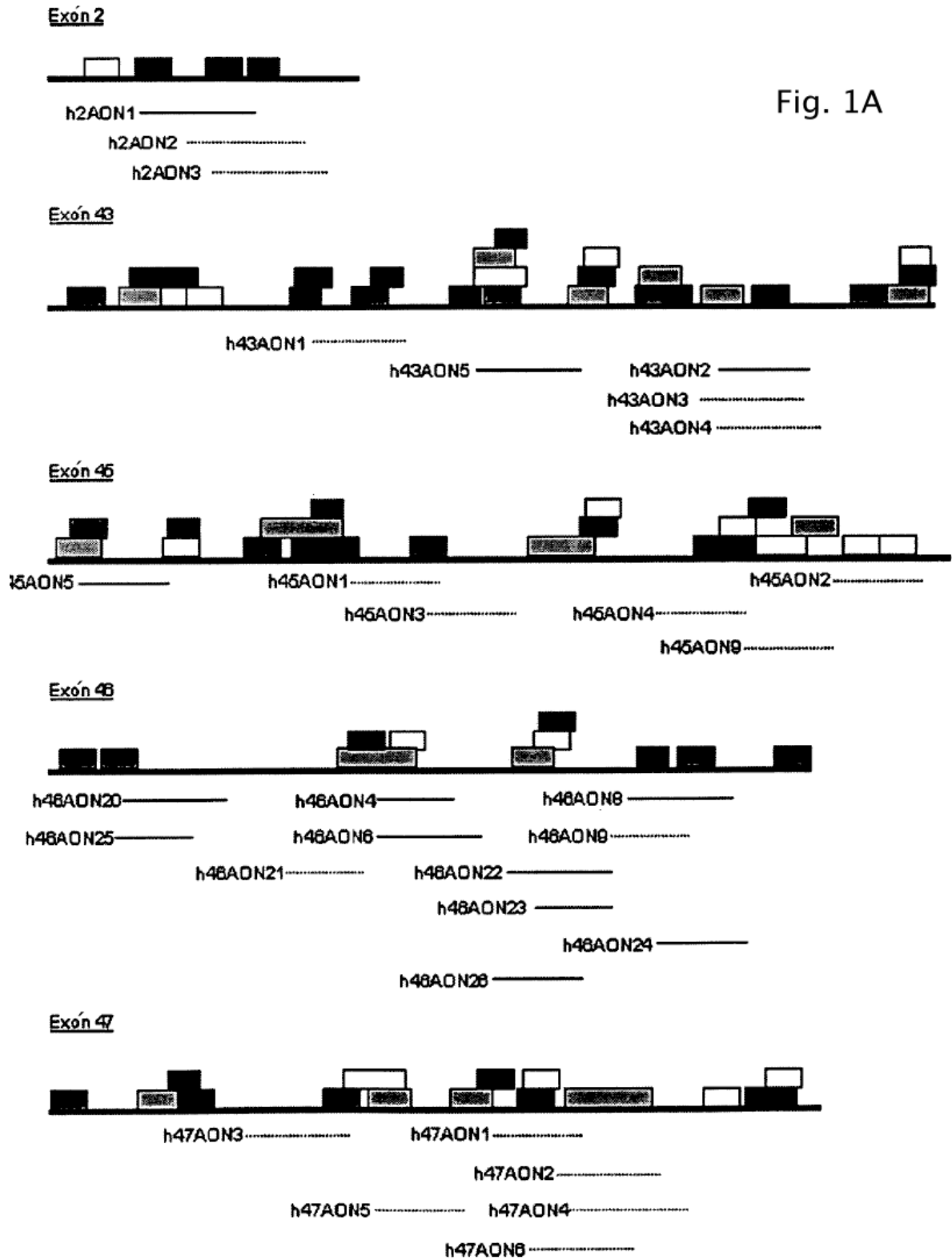
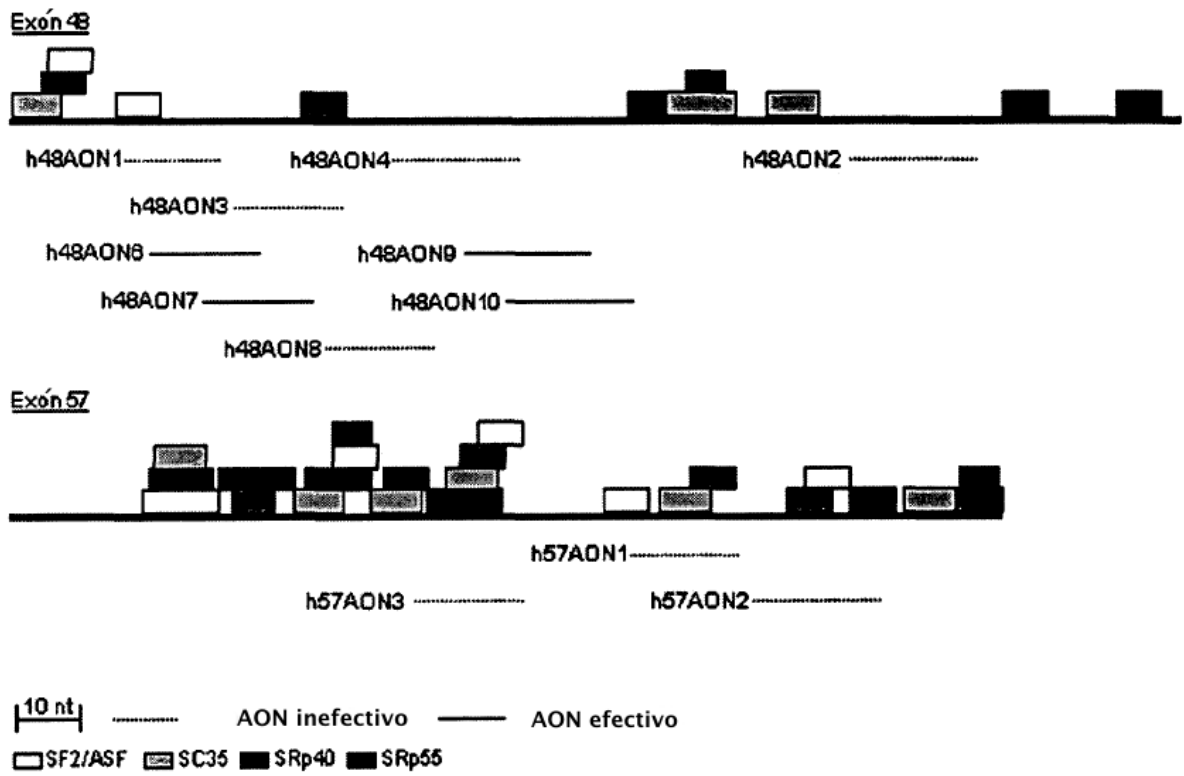


Fig. 1A

Fig. 1A, cont.



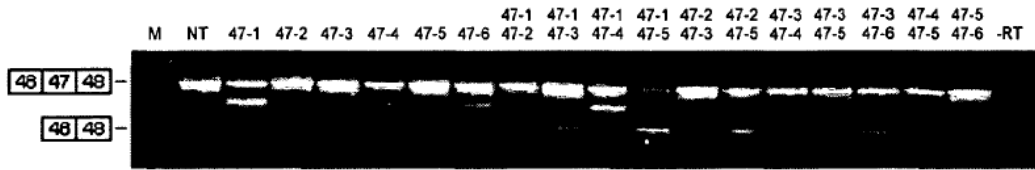


Fig. 1B

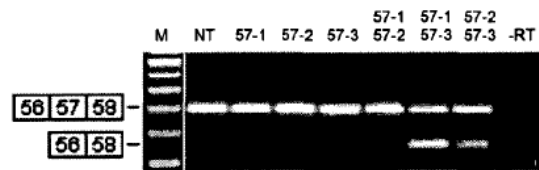


Fig. 1C

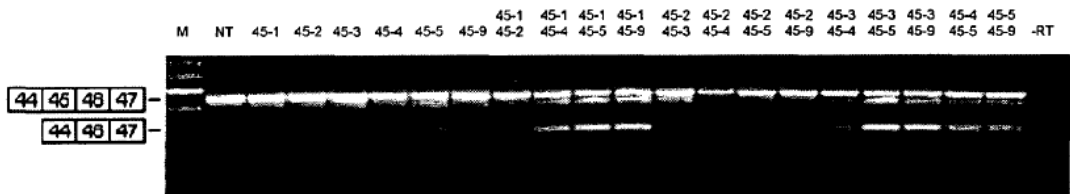


Fig. 1D

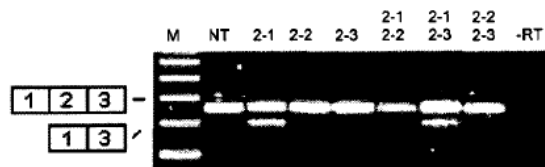


Fig. 1E