

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 886**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2009 PCT/NL2009/050113**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10050802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2009 E 09788170 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2349287**

54 Título: **Métodos y medios para el salto eficaz de al menos uno de los siguientes exones del gen de distrofia muscular de Duchenne humana: 43, 46, 50-53**

30 Prioridad:
27.10.2008 WO PCT/NL2008/050673

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.12.2018

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

72 Inventor/es:
**DE KIMPE, JOSEPHUS JOHANNES;
PLATENBURG, GERARDUS JOHANNES;
VAN DEUTEKOM, JUDITH CHRISTINA
THEODORA;
AARTSMA-RUS, ANNEMIEKE y
VAN OMMEN, GARRIT-JAN BOUDEWIJN**

74 Agente/Representante:
TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkingen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 692 886 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

Métodos y medios para el salto eficaz de al menos uno de los siguientes exones del gen de distrofia muscular de Duchenne humana: 43, 46, 50-53.

Campo

[0001] La invención se refiere al campo de la genética, más específicamente la genética humana. La invención en particular se refiere a la modulación del empalme del pre-ARNm de la distrofia muscular de Duchenne humana.

Antecedentes de la invención

[0002] Las miopatías son trastornos que resultan en degradación funcional de los músculos. La distrofia muscular (MD) se refiere a enfermedades genéticas que se caracterizan por debilidad y degeneración progresiva de los músculos esqueléticos. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (BMD) son las formas más comunes de distrofia muscular en la infancia. Son trastornos recesivos y, debido a que el gen responsable de la DMD y de la BMD reside en el cromosoma X, las mutaciones afectan principalmente a varones con una incidencia de aproximadamente 1 de 3500 niños.

[0003] La DMD y la BMD están causadas por defectos genéticos en el gen de DMD que codifica la distrofina, una proteína muscular que se requiere para las interacciones entre el citoesqueleto y la matriz extracelular para mantener la estabilidad de las fibras musculares durante la contracción. La DMD es un trastorno neuromuscular severo y letal que da como resultado una dependencia en soporte de silla de ruedas antes de la edad de 12 y los pacientes con DMD frecuentemente mueren antes de la edad de treinta debido a un fallo respiratorio o cardíaco. En cambio, los pacientes con BMD permanecen frecuentemente ambulatorios hasta más tarde en la vida y tienen esperanzas de vida casi normales. Las mutaciones DMD en el gen de DMD se caracterizan por inserciones o deleciones o mutaciones puntuales sin sentido que cambian el marco, dando como resultado la ausencia de distrofina funcional. Las mutaciones de BMD en general mantienen el marco de lectura intacto, permitiendo la síntesis de una distrofina parcialmente funcional.

[0004] Durante la última década, la modificación específica del empalme para restaurar el marco de lectura interrumpido de la transcripción de distrofina ha emergido como una terapia prometedora para la distrofia muscular de Duchenne (DMD) (van Ommen, van Deutekom, Aartsma-Rus, Curr Mol Opin Ther. 2008;10(2):140-9, Yokota, Duddy, Partidge, Acta Myol. 2007;26(3): 179-84, van Deutekom *et al.*, N Engl J Med. 2007;357(26):2677-86). Utilizando oligonucleótidos antisentido (AON) que interfieren con el empalme de señales, el salto de exones específicos se puede inducir en el pre-ARNm de DMD, restaurando así el marco de lectura abierto y convirtiendo la DMD severa en un fenotipo BMD más suave (van Deutekom *et al.* Hum Mol Genet. 2001; 10: 1547-54; Aartsma-Rus *et al.*, Hum Mol Genet 2003; 12(8):907-14.). La demostración conceptual *in vivo* se obtuvo primero en el modelo de ratón *mdx*, que tiene deficiencia de distrofina debido a una mutación sin sentido en el exón 23. Las inyecciones intramusculares e intravenosas de AON dirigidas al exón 23 mutado restauraron la expresión de distrofina durante al menos tres meses (Lu *et al.* Nat Med. 2003; 8: 1009-14; Lu *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(1):198-203). Esto se acompañó de restauración de proteínas asociadas a la distrofina en la membrana de la fibra, así como de mejora funcional del músculo tratado. El salto *in vivo* de exones humanos también se ha conseguido en el modelo de ratón con hDMD, que contiene una copia completa del gen de DMD humano integrado en el cromosoma 5 del ratón (Bremmer-Bout *et al.* Molecular Therapy. 2004; 10: 232-40; 't Hoen *et al.* J Biol Chem. 2008; 283: 5899-907).

[0005] Recientemente, un primer estudio en humanos se completó exitosamente donde un AON que induce el salto del exón 51 se inyectó en una pequeña área del músculo anterior tibial de cuatro pacientes con DMD. Nueva expresión de distrofina se observó en la mayoría de las fibras musculares en todos los cuatro pacientes tratados, y el AON fue seguro y bien tolerado (van Deutekom *et al.* N Engl J Med. 2007; 357: 2677-86).

Descripción de la invención

Método

[0006] La invención se define en las reivindicaciones. En un primer aspecto, la presente descripción proporciona un método para inducir y/o promover el salto de al menos uno de los exones 43, 46, 50-53 del pre-ARNm de DMD en un paciente, preferiblemente en una célula aislada de un paciente, donde el método comprende proporcionar a dicha célula y/o dicho paciente una molécula que se enlaza a una extensión continua de al menos 8 nucleótidos dentro de dicho exón.

[0007] Por consiguiente, un método según la invención se proporciona para inducir y/o promover el salto de al menos el exón 52 de pre-ARNm de DMD en una célula aislada de un paciente, donde el método comprende proporcionar a dicha célula y/o dicho paciente un oligonucleótido que se enlaza a una extensión continua de al

menos 8 nucleótidos dentro de dicho exón. Debe entenderse que dicho método abarca un método *in vitro* o *ex vivo*.

5 [0008] Tal y como se define en este documento, un pre-ARNm de DMD significa preferiblemente el pre-ARNm de un gen de DMD de un paciente con DMD o BMD.

10 [0009] Un paciente se entiende preferiblemente que significa un paciente con DMD o BMD como se define más tarde en este documento o un paciente susceptible de desarrollar DMD o BMD debido a su contexto genético. En el caso de un paciente con DMD, un oligonucleótido usado corregirá preferiblemente una mutación presente en el gen de DMD de dicho paciente y, por lo tanto, creará preferiblemente una proteína DMD que se parecerá a una proteína BMD: dicha proteína será preferiblemente una distrofina funcional como se define más tarde en este documento. En el caso de un paciente con BMD, un oligonucleótido usado corregirá preferiblemente una mutación presente en el gen BMD de dicho paciente y, por lo tanto, creará preferiblemente una distrofina que será más funcional que la distrofina que estaba originalmente presente en dicho paciente con BMD.

15 [0010] El salto del exón se refiere a la inducción en una célula de un ARNm maduro que no contiene un exón particular que está normalmente presente en el mismo. El salto del exón se realiza mediante una célula que expresa el pre-ARNm de dicho ARNm con una molécula capaz de interferir con secuencias esenciales tales como, por ejemplo, el donador de empalme de la secuencia de aceptor de empalme que se requiere para el empalme de dicho exón, o una molécula que es capaz de interferir con una señal de inclusión de exón que se requiere para el reconocimiento de una extensión de nucleótidos como un exón que se va a incluir en el ARNm. El término pre-ARNm se refiere a un ARNm precursor no procesado o parcialmente procesado que se sintetiza a partir de un modelo de ADN en el núcleo celular por transcripción.

20 [0011] En el contexto de la invención y divulgación, inducir y/o promover el salto de un exón como se indica en este documento significa que al menos el 1 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del ARNm de DMD en una o más células (musculares) de un paciente tratado no contendrá dicho exón. Esto se valora preferiblemente mediante PCR como se describe en los ejemplos.

25 [0012] Preferiblemente, un método de la invención o divulgación de inducir y/o promover el salto de al menos uno de los siguientes exones 43, 46, 50-53 del pre-ARNm de DMD en una o más células (musculares) de un paciente proporciona a dicho paciente una proteína distrofina funcional y/o reduce la producción de una proteína distrofina aberrante en dicho paciente y/o aumenta la producción de una distrofina funcional en dicho paciente. Proporcionar a un paciente una proteína distrofina funcional y/o disminuir la producción de una proteína distrofina aberrante en dicho paciente se aplica típicamente a un paciente con DMD. Aumentar la producción de una distrofina funcional se aplica típicamente a un paciente con BMD.

30 Por lo tanto, un método preferido de la invención o divulgación es un método donde a un paciente o a una o más células de dicho paciente se proporciona una proteína distrofina funcional y/o donde la producción de una proteína distrofina aberrante en dicho paciente se disminuye y/o donde la producción de una distrofina funcional se aumenta en dicho paciente, donde el nivel de dicha distrofina aberrante o funcional se evalúa por comparación con el nivel de dicha distrofina en dicho paciente al inicio del método. La disminución de la producción de una distrofina aberrante se puede evaluar en el nivel de ARNm y preferiblemente significa que el 99 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o menos de la cantidad inicial de ARNm de distrofina aberrante sigue siendo detectable por RT-PCR. Un ARNm o proteína distrofina aberrante también se denomina en este caso como un ARNm o proteína distrofina no funcional. Una proteína distrofina no funcional es preferiblemente una proteína distrofina que no es capaz de enlazarse a actina y/o miembros del complejo de proteína DGC. Un ARNm de proteína distrofina o de distrofina no funcional no tiene típicamente, o no codifica, una proteína distrofina con un C-terminal intacto de la proteína.

35 El incremento de la producción de una distrofina funcional en dicho paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel de ARNm (por análisis RT-PCR) y preferiblemente significa que una cantidad detectable de un ARNm de distrofina funcional es detectable por RT-PCR. En otra forma de realización, el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del ARNm de distrofina detectable es un ARNm de distrofina funcional.

40 [0013] El aumento de la producción de una distrofina funcional en dicho paciente o en una célula de dicho paciente se puede evaluar en el nivel de proteína (por análisis de inmunofluorescencia y de transferencia Western) y preferiblemente significa que una cantidad detectable de una proteína distrofina funcional es detectable por análisis de inmunofluorescencia o de transferencia Western. En otra forma de realización, el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de la proteína distrofina detectable es una proteína distrofina funcional.

45 [0014] Tal y como se define en este documento, una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina de tipo salvaje que corresponde con una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos identificada en la SEQ ID N.º: 1. Una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina, que tiene un dominio de enlace a actina en su parte N terminal (primeros 240 aminoácidos en el N terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácidos 3361 hasta 3685) y un dominio C terminal (últimos 325 aminoácidos en el C terminal) donde cada uno de estos dominios

están presentes en una distrofina de tipo salvaje como es conocido para la persona experta. Los aminoácidos indicados en este documento corresponden a los aminoácidos de la distrofina de tipo salvaje que se representan en la SEQ ID N.º: 1. En otras palabras, una distrofina funcional es una distrofina que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de una distrofina de tipo salvaje. "Al menos hasta cierto punto" significa preferiblemente al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de una actividad correspondiente de una distrofina funcional de tipo salvaje. En este contexto, una actividad de una distrofina funcional es preferiblemente enlace a actina y al complejo de glicoproteína asociada a distrofina (DGC) (Aartsma-Rus A *et al*, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). El enlace de distrofina a actina y al complejo DGC se puede visualizar o bien por coimmunoprecipitación usando extractos de proteína total o bien por análisis de inmunofluorescencia de secciones transversales, a partir de una biopsia muscular, como es conocido para la persona experta.

[0015] Los individuos o pacientes que padecen distrofia muscular de Duchenne tienen típicamente una mutación en el gen que codifica la distrofina que evita la síntesis de la proteína completa, es decir, de una parada prematura evita la síntesis del C-terminal. En la distrofia muscular de Becker, el gen de DMD también comprende una mutación en comparación con el gen de tipo salvaje, pero la mutación no induce típicamente una parada prematura y el C-terminal se sintetiza típicamente. Como resultado, se sintetiza una proteína distrofina funcional que tiene al menos la misma especie de actividad que la proteína de tipo salvaje, aunque no necesariamente la misma cantidad de actividad. El genoma de un individuo con BMD codifica típicamente una proteína distrofina que comprende la parte N terminal (primeros 240 aminoácidos en el N terminal), un dominio rico en cisteína (aminoácidos 3361 hasta 3685) y un dominio C terminal (últimos 325 aminoácidos en el C terminal), pero su dominio con forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A *et al*, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 34: 135-144). El salto del exón para el tratamiento de la DMD se dirige típicamente a superar una parada prematura en el pre-ARNm mediante el salto de un exón en el dominio en forma de barra para corregir el marco de lectura y permitir la síntesis del resto de la proteína distrofina que incluye el C-terminal, aunque la proteína sea algo más pequeña como resultado de un dominio de barra menor. En una forma de realización preferida, a un individuo que tiene DMD y en tratamiento con un método tal y como se define en este documento se le proporcionará una distrofina que muestra al menos hasta cierto punto una actividad de una distrofina de tipo salvaje. Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente con Duchenne o se sospecha que es un paciente con Duchenne, una distrofina funcional es una distrofina de un individuo con BMD: típicamente dicha distrofina es capaz de interactuar tanto con la actina como con el DGC, pero su dominio con forma de barra central puede ser más corto que el de una distrofina de tipo salvaje (Aartsma-Rus A *et al*, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). El dominio en forma de barra central de la distrofina de tipo salvaje comprende 24 repeticiones de tipo espectrina (Aartsma-Rus A *et al*, (2006), Entries in the leiden Duchenne Muscular Dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule, Muscle Nerve, 34: 135-144). Por ejemplo, un dominio en forma de barra central de una distrofina como se proporciona en este documento puede comprender de 5 a 23, de 10 a 22 o de 12 a 18 repeticiones de tipo espectrina siempre y cuando se pueda enlazar a actina y a DGC.

[0016] Un método de la invención o divulgación puede aliviar una o más características de una célula miogénica o muscular de un paciente o aliviar uno o más síntomas de un paciente con DMD que tiene una delección que incluye, pero de forma no limitativa, los exones 44, 44-46, 44-47, 44-48, 44-49, 44-51, 44-53 (corregible por salto del exón 43), 19-45, 21-45, 43-45, 45, 47-54, 47-56 (corregible por salto del exón 46), 51, 51-53, 51-55, 51-57 (corregible por salto del exón 50), 13-50, 19-50, 29-50, 43-50, 45-50, 47-50, 48-50, 49-50, 50, 52 (corregible por salto del exón 51), los exones 8-51, 51, 53, 53-55, 53-57, 53-59, 53-60, (corregible por salto del exón 52) y los exones 10-52, 42-52, 43-52, 45-52, 47-52, 48-52, 49-52, 50-52, 52 (corregible por salto del exón 53) en el gen de DMD, que ocurre en un total del 68 % de todos los pacientes con DMD con una delección (Aartsma-Rus *et al*, Hum. Mut. 2009).

Alternativamente, un método de la invención o divulgación puede mejorar una o más características de una célula muscular de un paciente o aliviar uno o más síntomas de un paciente con DMD que tiene mutaciones pequeñas en, o duplicaciones de exón único del exón 43, 46, 50-53 en el gen de DMD, que ocurre en un total del 36 % de todos los pacientes con DMD con una delección (Aartsma-Rus *et al*, Hum. Mut. 2009)

[0017] Además, para algunos pacientes se requiere el salto simultáneo de uno de más exones además del exón 43, exón 46 y/o exón 50-53 para restaurar el marco de lectura abierto, entre los que se incluyen pacientes con delecciones específicas, mutaciones (puntuales) pequeñas, o duplicaciones de exón dobles o múltiples, tales como (pero de forma no limitativa) una delección de los exones 44-50 que requiere el salto conjunto de los exones 43 y 51, con una delección de los exones 46-50 que requiere el salto conjunto de los exones 45 y 51, con una delección de los exones 44-52 que requiere el salto conjunto de los exones 43 y 53, con una delección de los exones 46-52 que requiere el salto conjunto de los exones 45 y 53, con una delección de los exones 51-54 que requiere el salto conjunto de los exones 50 y 55, con una delección de los exones 53-54 que requiere el salto conjunto de los exones 52 y 55, con una delección de los exones 53-56 que requiere el salto conjunto de los

exones 52 y 57, con una mutación sin sentido en el exón 43 o el exón 44 que requiere el salto conjunto de los exones 43 y 44, con una mutación sin sentido en el exón 45 o el exón 46 que requiere el salto conjunto de los exones 45 y 46, con una mutación sin sentido en el exón 50 o el exón 51 que requiere el salto conjunto de los exones 50 y 51, con una mutación sin sentido en el exón 51 o el exón 52 que requiere el salto conjunto de los exones 51 y 52, con una mutación sin sentido en el exón 52 o el exón 53 que requiere el salto conjunto de los exones 52 y 53, o con una duplicación de exón doble o múltiple que implica a los exones 43, 46, 50, 51, 52, y/o 53.

[0018] En un método preferido de la divulgación, se induce el salto del exón 43, o se induce el salto del exón 46, o se induce el salto del exón 50, o se induce el salto del exón 51, o se induce el salto del exón 52, o se induce el salto del exón 53. Una inducción del salto de dos de estos exones también se abarca por un método de la divulgación. Por ejemplo, preferiblemente el salto de los exones 50 y 51, o 52 y 53, o 43 y 51, o 43 y 53, o 51 y 52. Dependiendo del tipo y de la identidad (los exones específicos implicados) de la mutación identificada en un paciente, la persona experta conocerá qué combinación de exones se necesita saltarse en dicho paciente.

[0019] En un método preferido, uno o más síntomas de un paciente con DMD o BMD se alivia(n) y/o una o más características de una o más células musculares de un paciente con DMD o BMD se mejora(n). Tales síntomas o características se pueden evaluar en el nivel de célula, de tejido o en el propio paciente.

[0020] Un alivio de una o más características se puede evaluar por cualquiera de los ensayos siguientes en una célula miogénica o célula muscular de un paciente: absorción de calcio reducida por células musculares, síntesis de colágeno disminuida, morfología alterada, biosíntesis de lípidos alterada, estrés oxidativo disminuido, y/o función, integridad, y/o supervivencia mejorada de las fibras musculares. Estos parámetros se evalúan normalmente usando análisis de inmunofluorescencia y/o histoquímicos de secciones transversales a partir de biopsias musculares.

La mejora de la función, integridad y/o supervivencia de las fibras musculares se puede evaluar utilizando al menos uno de los siguientes ensayos: una reducción detectable de quinasa creatina en la sangre, una reducción detectable de necrosis de fibras musculares en una sección transversal de biopsia de un músculo sospechoso de ser distrófico, y/o un aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de las fibras musculares en una sección transversal de biopsia de un músculo sospechoso de ser distrófico. Cada uno de estos ensayos es conocido para la persona experta.

[0021] La quinasa creatina se puede detectar en la sangre como se describe en Hodgetts *et al* (Hodgetts S., *et al*, (2006), *Neuromuscular Disorders*, 16: 591-602.2006). Una reducción detectable de quinasa creatina puede significar una reducción del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en comparación con la concentración de quinasa creatina en un mismo paciente con DMD o BMD antes del tratamiento.

[0022] Una reducción detectable de necrosis de fibras musculares se evalúa preferiblemente en una biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en Hodgetts *et al* (Hodgetts S., *et al*, (2006), *Neuromuscular Disorders*, 16: 591-602.2006) usando secciones transversales de biopsia. Una reducción detectable de necrosis puede ser una reducción del 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más del área donde la necrosis se ha identificado usando secciones transversales de biopsia. La reducción se mide por comparación con la necrosis evaluada en un mismo paciente con DMD o BMD antes del tratamiento.

[0023] Un aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de una fibra muscular se evalúa preferiblemente en una sección transversal de biopsia muscular, más preferiblemente como se describe en Hodgetts *et al* (Hodgetts S., *et al*, (2006), *Neuromuscular Disorders*, 16: 591-602.2006). El aumento se mide por comparación con la homogeneidad del diámetro de una fibra muscular en un mismo paciente con DMD o BMD antes del tratamiento.

Un alivio de uno o más síntomas se puede evaluar por cualquiera de los ensayos siguientes en el propio paciente: prolongación del tiempo para perder la capacidad de andar, mejora de la fuerza muscular, mejora de la capacidad para levantar peso, mejora del tiempo necesitado para levantarse del suelo, mejora en el tiempo para andar nueve metros, mejora en el tiempo necesitado para subir cuatro escalones, mejora del grado de función de la pierna, mejora de la función pulmonar, mejora de la función cardíaca, mejora de la calidad de vida. Cada uno de estos ensayos es conocido para la persona experta. Como un ejemplo, la publicación de Manzur *et al* (Manzur AY *et al*, (2008), *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy* (revisión), Wiley publishers, The Cochrane collaboration.) da una explicación extensa de cada uno de estos ensayos. Para cada uno de estos ensayos, tan pronto como se descubre una mejora detectable o una prolongación de un parámetro medido en un ensayo, significará preferiblemente que uno o más síntomas de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker se han aliviado en un individuo utilizando un método de la invención. La mejora o prolongación detectable es preferiblemente una mejora o prolongación estadísticamente significativa como se describe en Hodgetts *et al* (Hodgetts S., *et al*, (2006), *Neuromuscular Disorders*, 16: 591-602.2006). Alternativamente, el alivio de uno o más síntomas de distrofia muscular de Duchenne o de distrofia muscular de Becker se puede evaluar midiendo una mejora de una función, integridad y/o supervivencia de la fibra muscular como se define más tarde en este documento.

[0024] Un tratamiento en un método según la invención puede tener una duración de al menos una semana, al menos un mes, al menos varios meses, al menos un año, al menos 2, 3, 4, 5, 6 años o más.

Cada molécula u oligonucleótido o equivalente de los mismos tal y como se define en este documento para el uso según la invención puede ser adecuado para la administración directa a una célula, un tejido y/o un órgano *in vivo* de individuos afectados por DMD o BMD o en riesgo de desarrollarla, y se puede administrar directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La frecuencia de administración de una molécula o un oligonucleótido o una composición de la invención puede depender de diferentes parámetros tales como la edad del paciente, la mutación del paciente, el número de moléculas (dosis), la formulación de dicha molécula. La frecuencia puede oscilar entre al menos una vez cada dos semanas, o tres semanas o cuatro semanas o cinco semanas o un período de tiempo más largo.

[0025] Una molécula u oligonucleótido o equivalente de los mismos se puede administrar como tal a una célula. Al administrar dicha molécula, oligonucleótido o equivalente de los mismos a un individuo, se prefiere que esté disuelto en una solución que sea compatible con el método de administración. Para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal y/o intraventricular, se prefiere que la solución sea una solución salina fisiológica. Particularmente preferido para un método de la invención es el uso de un excipiente que mejorará adicionalmente la administración de dicha molécula, oligonucleótido o equivalente funcional de los mismos tal y como se define en este documento, a una célula y en una célula, preferiblemente una célula muscular. Los excipientes preferidos se definen en el apartado titulado "Composición farmacéutica".

[0026] En un método preferido de la invención, se usa un oligonucleótido antisentido adicional que es capaz de inducir y/o promover el salto de otro exón del pre-ARNm de DMD de un paciente. Preferiblemente, el segundo exón se selecciona de: exón 51, 53, 55, 57, 59 o 69 del pre-ARNm de DMD de un paciente. Las moléculas que se pueden usar se representan en cualquiera de las tablas 1 a 7. De esta manera, se evita la inclusión de dos o más exones de un pre-ARNm de DMD en ARNm producido a partir de este pre-ARNm. Esta forma de realización es posteriormente referida como salto de exón doble o múltiple (Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, *et al.* Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am J Hum Genet* 2004;74(1):83-92, Aartsma-Rus A, Kaman WE, Weij R, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Exploring the frontiers of therapeutic exon skipping for Duchenne muscular dystrophy by double targeting within one or multiple exons. *Mol Ther* 2006;14(3):401-7). En la mayoría de los casos, el salto del exón doble produce la exclusión de solo los dos seleccionados como objetivo del pre-ARNm de DMD. Sin embargo, en otros casos se ha observado que los exones objetivo y toda la región entremedias de dichos exones en dicho pre-ARNm no estaban presentes en el ARNm producido incluso cuando otros exones (exones intervinientes) estaban presentes en tal región. Este salto múltiple fue, por lo tanto, notable para la combinación de oligonucleótidos derivados del gen de DMD, donde un oligonucleótido para el exón 45 y un oligonucleótido para el exón 51 se añadieron a una célula que transcribe el gen de DMD. Tal disposición resultó en la producción de ARNm que no contenía los exones 45 a 51. Aparentemente, la estructura del pre-ARNm en presencia de los oligonucleótidos mencionados fue tal que la maquinaria de empalme se estimuló para conectar los exones 44 y 52 entre sí.

Es posible promover específicamente el salto de también los exones intervinientes proporcionando un enlace entre los dos oligonucleótidos complementarios. Por lo tanto, en una forma de realización, extensiones de nucleótidos complementarios a al menos dos exones de distrofina se separan por una fracción de enlace. Al menos dos extensiones de nucleótidos se enlazan así en esta forma de realización para formar una molécula única.

[0027] En el caso de que se usen más de un compuesto o una molécula en un método de la invención o divulgación, dichos compuestos se pueden administrar a un individuo en cualquier orden. En una forma de realización, dichos compuestos se administran simultáneamente (lo que significa que dichos compuestos se administran en 10 horas, preferiblemente en una hora). Esto, sin embargo, no es necesario. En otra forma de realización, dichos compuestos se administran consecutivamente.

Molécula

[0028] En un segundo aspecto, se proporciona una molécula para el uso en un método como se describe en el apartado precedente titulado "Método". Una molécula tal y como se define en este documento es preferiblemente un oligonucleótido u oligonucleótido antisentido (AON).

[0029] Se ha descubierto por los presentes investigadores que cualquiera de los exones 43, 46, 50-53 se salta específicamente a una alta frecuencia utilizando una molécula que preferiblemente se enlaza a una extensión continua de al menos 8 nucleótidos dentro de dicho exón. Aunque este efecto se puede asociar a una afinidad de enlace superior de dicha molécula, en comparación con una molécula que se enlaza a una extensión continua inferior a 8 nucleótidos, podría haber otros parámetros intracelulares implicados que favorecen las características termodinámicas, cinéticas o estructurales del dúplex híbrido. En una forma de realización preferida, se usa una molécula que se enlaza a una extensión continua de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleótidos dentro de dicho exón.

[0030] En una forma de realización preferida, una molécula o un oligonucleótido de la divulgación que comprende una secuencia que es complementaria a una parte de cualquiera de los exones 43, 46, 50, 51 o 53 de pre-ARNm de DMD, o una molécula o un oligonucleótido de la invención que comprende una secuencia que es complementaria a una parte del exón 52 de pre-ARNm de DMD, es tal que la parte complementaria es al menos el 50 % de la longitud del oligonucleótido de la invención, más preferiblemente al menos el 60 %, aún más preferiblemente al menos el 70 %, aún más preferiblemente al menos el 80 %, aún más preferiblemente al menos el 90 % o aún más preferiblemente al menos el 95 %, o aún más preferiblemente el 98 % y de la forma más preferible hasta el 100 %. "Una parte de dicho exón" significa preferiblemente una extensión de al menos 8 nucleótidos. En una forma de realización más preferida, un oligonucleótido de la invención o divulgación consiste en una secuencia que es complementaria a parte de dicho exón pre-ARNm de DMD tal y como se define en este documento. Por ejemplo, un oligonucleótido puede comprender una secuencia que es complementaria a parte de dicho pre-ARNm de DMD de exón tal y como se define en este documento y secuencias flanqueadoras adicionales. En una forma de realización más preferida, la longitud de dicha parte complementaria de dicho oligonucleótido es de al menos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 nucleótidos. Preferiblemente, se utilizan secuencias flanqueadoras adicionales para modificar el enlace de una proteína a dicha molécula u oligonucleótido, o para modificar una propiedad termodinámica del oligonucleótido, más preferiblemente para modificar la afinidad de enlace a ARN objetivo.

[0031] Una molécula preferida para usarse en un método de la divulgación se enlaza o es complementaria a una extensión continua de al menos 8 nucleótidos en una de las siguientes secuencias de nucleótidos seleccionadas de:

5'-AGAUAGUCUACAACAAAGCUCAGGUCGGAUUGACAUAUUAUUAUAGCAAGAAGACAGCAGCA-UUGCAAAGUGCAACGCCUGUGG-3' (SEQ ID N.º: 2) para el salto del exón 43;

5'-JUAUGGUUGGAGGAAGCAGAUAAAUUGCUAGUAUCCACUUGAACCUUGGAAAAGAGCAG-CAACUAAAAGAAAAGC-3' (SEQ ID N.º: 3) para el salto del exón 46;

5'-GGCGGTAAACCGUUUACUUAAGAGCUGAGGGCAAAGCAGCCUGACCUAGC UCCUGGACUGACCACUAUUGG-3' (SEQ ID N.º: 4) para el salto del exón 50;

5'-CUCCUACUCAGACUGUUACUCUGGUGACACAACCUUGUGGUUACUAAGGAAACUGCCAUCUCCAA ACUAGAAAUGCCAUCUCCUUGAUGUUGGAGGUAC-3' (SEQ ID N.º: 5) para el salto del exón 51; y

5'-AAAUGUUAAGGAUUAACACAUAUGGCUGGAAGCUAAGGAAGAAGCUGAGCAGGUCUUAG-GACAGGCCAGAG-3' (SEQ ID N.º: 7) para el salto del exón 53.

[0032] Una molécula preferida para usarse en un método de la invención se enlaza o es complementaria a una extensión continua de al menos 8 nucleótidos en la siguiente secuencia de nucleótidos: 5'-AUGCAGGAUUUGGAACAGAGGCGUCCCGUUGGAAGAAGCUCUUAUACCGCUGCCCAAAUU-UGAAAACAAGACCAGCAUCAAGAGGCU-3' (SEQ ID N.º: 6) para el salto del exón 52.

[0033] De las numerosas moléculas que teóricamente se pueden preparar para enlazarse a las extensiones continuas de nucleótidos tal y como se define en las SEQ ID N.º 2-7 en uno de dichos exones, la invención y divulgación proporcionan moléculas diferentes que se pueden usar en un método para el salto eficaz de al menos uno del exón 43, exón 46 y/o exón 50-53. Aunque el efecto del salto se puede conducir a la densidad relativamente alta de los sitios de enlace a proteínas SR putativos en dichas extensiones, podría haber otros parámetros implicados que favorecen la absorción de la molécula u otros parámetros intracelulares tales como características termodinámicas, cinéticas o estructurales del dúplex híbrido.

[0034] Se descubrió que una molécula que se enlaza a una extensión continua comprendida en o consistente en cualquiera de las SEQ ID N.º 2-7 resulta en el salto altamente eficaz del exón 43, exón 46 y/o exón 50-53 respectivamente en una célula y/o en un paciente al que se proporciona esta molécula. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, se proporciona un método donde una molécula se enlaza a una extensión continua de al menos 8, 10, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 nucleótidos en las SEQ ID N.º 2-7.

[0035] En una forma de realización preferida para inducir y/o promover el salto de cualquiera del exón 43, exón 46 y/o exón 50-53, la invención o divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en una secuencia de nucleótidos antisentido seleccionada de las secuencias de nucleótidos antisentido representadas en cualquiera de las tablas 1 a 6. Una molécula de la divulgación preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 16, SEQ ID N.º 65, SEQ ID N.º 70, SEQ ID N.º 91, SEQ ID N.º 110, SEQ ID N.º 117, SEQ ID N.º 127, SEQ ID N.º 165, SEQ ID N.º 166, SEQ ID N.º 167, SEQ ID N.º 246, SEQ ID N.º 299, SEQ ID N.º: 357.

[0036] Una molécula preferida de la divulgación comprende una secuencia basada en nucleótidos, de nucleótidos o de oligonucleótidos antisentido de entre 8 y 50 nucleótidos o bases, más preferido de entre 10 y 50 nucleótidos, más preferido de entre 20 y 40 nucleótidos, más preferido de entre 20 y 30 nucleótidos, tal como 20 nucleótidos, 21 nucleótidos, 22 nucleótidos, 23 nucleótidos, 24 nucleótidos, 25 nucleótidos, 26 nucleótidos, 27 nucleótidos, 28 nucleótidos, 29 nucleótidos, 30 nucleótidos, 31 nucleótidos, 32 nucleótidos, 33 nucleótidos, 34 nucleótidos, 35 nucleótidos, 36 nucleótidos, 37 nucleótidos, 38 nucleótidos, 39 nucleótidos, 40 nucleótidos, 41 nucleótidos, 42 nucleótidos, 43 nucleótidos, 44 nucleótidos, 45 nucleótidos, 46 nucleótidos, 47 nucleótidos, 48 nucleótidos, 49 nucleótidos o 50 nucleótidos.

Una molécula más preferida de la invención o divulgación comprende una secuencia basada en nucleótidos de 25 nucleótidos.

[0037] Además, ninguna de las secuencias indicadas se deriva de partes conservadas de sitios de unión de empalme. Por lo tanto, dicha molécula no es probable que medie el empalme diferencial de otros exones del pre-ARNm de DMD o exones de otros genes.

[0038] En una forma de realización, una molécula de la invención o divulgación es una molécula compuesta que se enlaza a la secuencia específica, o una proteína tal como una proteína de enlace a ARN o una proteína de dedo de zinc no natural que se ha modificado para ser capaz de enlazarse a la secuencia de nucleótidos correspondiente en una molécula de pre-ARN de DMD. Los métodos para cribar moléculas compuestas que se enlazan a secuencias de nucleótidos específicas se describen, por ejemplo, en PCT/NL01/00697 y en la patente de EE. UU. 6,875,736. Los métodos para diseñar proteínas de dedo de zinc de enlace a ARN que se enlazan a secuencias de nucleótidos específicas se describen por Friesen y Darby, Nature Structural Biology 5: 543-546 (1998).

[0039] Una molécula preferida de la divulgación se enlaza al menos parte de la secuencia de la SEQ ID N.º 2: 5'-AGAUAGUCUACAACAAAGCUCAGGUCGGAUUGACAUUAUUCAUAGCAAGAAGACAGCAGCA-UUGCAAAGUGCAACGCCUGUGG-3' que está presente en el exón 43 del gen de DMD. Más preferiblemente, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 8 a la SEQ ID N.º 69. En una forma de realización más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 16 y/o la SEQ ID N.º 65.

En una forma de realización más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 65. Se descubrió que esta molécula es muy eficaz en la modulación del empalme del exón 43 del pre-ARNm de DMD en una célula muscular y/o en un paciente.

[0040] Otra molécula preferida de la divulgación se enlaza a al menos parte de la secuencia de la SEQ ID N.º 3: 5'-UUAUGGUUGGAGGAAGCAGAUACAUAUUGCUAGUAUCCACUUGAACCCUGGAAAAGAGCAG-CAACUAAAAGAAAAGC-3' que está presente en el exón 46 del gen de DMD. Más preferiblemente, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 70 a la SEQ ID N.º 122.

En una forma de realización aún más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 70, SEQ ID N.º 91, SEQ ID N.º 110, y/o SEQ ID N.º 117.

En una forma de realización más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 117. Se descubrió que esta molécula es muy eficaz en la modulación del empalme del exón 46 del pre-ARNm de DMD en una célula muscular o en un paciente.

[0041] Otra molécula preferida de la divulgación se enlaza a al menos parte de la secuencia de la SEQ ID N.º 4: 5'-GGCGGTAAACCGUUUACUUAAGAGCUGAGGGCAAAGCAGCCUGACCUAGCUCCUGGACU-GACCACUAUUGG-3' que está presente en el exón 50 del gen de DMD. Más preferiblemente, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 123 a la SEQ ID N.º 167 y/o de la SEQ ID N.º 529 a la SEQ ID N.º 535.

En una forma de realización aún más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 127, o la SEQ ID N.º 165, o la SEQ ID N.º 166 y/o la SEQ ID N.º 167.

En una forma de realización más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 127. Se descubrió que esta molécula es muy eficaz en la modulación del empalme del exón 50 del pre-ARNm de DMD en una célula muscular y/o en un paciente.

[0042] Otra molécula preferida de la divulgación se enlaza a al menos parte de la secuencia de la SEQ ID N.º 5: 5'-

CUCCUACUCAGACUGUUACUCUGGUGACACAACCCUGUGGUUACUAAGGAAACUGCCAUCUCCAAACUAGA AA

UGCCAUCUCCUUGAUGUUGGAGGUAC-3' que está presente en el exón 51 del gen de DMD. Más preferiblemente, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 168 la SEQ ID N.º 241.

[0043] Otra molécula preferida de la invención se enlaza a al menos parte de la secuencia de la SEQ ID N.º 6: 5'-AUGCAGGAUUUGGAACAGAGGCGUCCCCAGUUGGAAGAACUCAUUACCGCUGCCCAAAUU-UGAAAAACAAGACCAGCAAUCAAGAGGCU-3' que está presente en el exón 52 del gen de DMD. Más preferiblemente, la invención o la divulgación proporcionan una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 242 a la SEQ ID N.º 310. En una forma de realización aún más preferida, la invención o divulgación proporcionan una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 246 y/o la SEQ ID N.º 299. En una forma de realización más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 299. Se descubrió que esta molécula es muy eficaz en la modulación del empalme del exón 52 del pre-ARNm de DMD en una célula muscular y/o en un paciente. La invención proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º: 287.

[0044] Otra molécula preferida de la divulgación se enlaza a al menos parte de la secuencia de la SEQ ID N.º 7: 5'-AAAUGUUAAAGGAUUCACACAAUGGCUUGGAAGCUAAGGAAGAAGCUGAGCAGGUCUUAG-GACAGGCCAGAG-3' que está presente en el exón 53 del gen de DMD. Más preferiblemente, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 311 a la SEQ ID N.º 358.

En una forma de realización más preferida, la divulgación proporciona una molécula que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido de la SEQ ID N.º 357. Se descubrió que esta molécula es muy eficaz en la modulación del empalme del exón 53 del pre-ARNm de DMD en una célula muscular y/o en un paciente.

[0045] Una secuencia de nucleótidos de una molécula de la invención y divulgación puede contener residuos de ARN, o uno o más residuos de ADN, y/o uno o más análogos de nucleótido o equivalentes, como se detallará adicionalmente a continuación en este documento.

[0046] Se prefiere que una molécula de la invención comprenda uno o más residuos que se modifican para aumentar la resistencia a nucleasa, y/o para aumentar la afinidad del nucleótido antisentido a la secuencia objetivo. Por lo tanto, en una forma de realización preferida, la secuencia del nucleótido antisentido comprende al menos un análogo de nucleótido o equivalente, donde un análogo de nucleótido o equivalente se define como un residuo con una base modificada, y/o un esqueleto modificado, y/o un enlace internucleósido no natural, o una combinación de estas modificaciones.

[0047] En una forma de realización preferida, el análogo de nucleótido o equivalente comprende un esqueleto modificado. Ejemplos de tales esqueletos se proporcionan por esqueletos de morfolino, esqueletos de carbamato, esqueletos de siloxano, esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona, esqueletos de formacetilo y tioformacetilo, esqueletos de metilenoformacetilo, esqueletos de riboacetilo, esqueletos que contienen alqueno, esqueletos de sulfamato, sulfonato y sulfonamida, esqueletos de metileneimino y metilenoimidazino, y esqueletos de amida. Los oligómeros de morfolino fosforodiamidato son oligonucleótidos con esqueleto modificado que se han investigado previamente como agentes antisentido. Los oligonucleótidos de morfolino tienen un esqueleto sin carga donde el azúcar desoxirribosa del ADN se sustituye por un anillo de seis miembros y el enlace fosfodiéster se sustituye por un enlace fosforodiamidato. Los oligonucleótidos de morfolino son resistentes a la degradación enzimática y parecen funcionar como agentes antisentido por obstaculizar la traducción o interferir con el empalme de pre-ARNm en vez de por activar la RNasa H. Los oligonucleótidos de morfolino se han administrado exitosamente a células de cultivo de tejido por métodos que interrumpen físicamente la membrana celular, y un estudio que compara diferentes de estos métodos descubrió que la carga de raspaduras fue el método de administración más eficaz; sin embargo, debido a que el esqueleto de morfolino está sin carga, los lípidos catiónicos no son mediadores eficaces de la absorción de oligonucleótidos de morfolino en las células. Un informe reciente demostró la formación de tríplex por un oligonucleótido de morfolino y, debido al esqueleto no iónico, estos estudios mostraron que el oligonucleótido de morfolino fue capaz de formar tríplex en ausencia de magnesio.

[0048] Se prefiere adicionalmente que el enlace entre los residuos en un esqueleto no incluya un átomo de fósforo, tal como un enlace que se forma por enlaces internucleósidos de alquilo o de cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósidos de heteroátomo y alquilo o de cicloalquilo mixtos, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta.

[0049] Un análogo de nucleótido o equivalente preferido comprende un ácido nucleico peptídico (PNA), con un esqueleto de poliamida modificada (Nielsen, *et al.* (1991) *Science* 254, 1497-1500). Las moléculas basadas en PNA son imitaciones reales de moléculas de ADN en cuanto a reconocimiento de pares bases. El esqueleto del PNA está compuesto de unidades de *N*-(2-aminoetil)-glicina enlazadas por enlaces peptídicos, donde las nucleobases se enlazan al esqueleto mediante enlaces de metileno-carbonilo. Un esqueleto alternativo comprende un monómero de PNA de pirrolidina extendido con un carbono (Govindaraju y Kumar (2005) *Chem. Commun.* 495-497). Dado que el esqueleto de una molécula de PNA contiene grupos fosfato no cargados, los híbridos PNA-ARN son normalmente más estables que los híbridos ARN-ARN o ARN-ADN, respectivamente (Egholm *et al.* (1993) *Nature* 365, 566-568).

[0050] Un esqueleto preferido adicional comprende un análogo de nucleótido de morfolino o equivalente, donde el azúcar ribosa o desoxirribosa se sustituye por un anillo de morfolino de 6 miembros. Un análogo de nucleótido o equivalente más preferido comprende un oligómero de morfolino fosfordiamidato (PMO), donde el azúcar ribosa o desoxirribosa se sustituye por un anillo de morfolino de 6 miembros, y el enlace fosfodiéster aniónico entre anillos de morfolino adyacentes se sustituye por un enlace fosfordiamidato no iónico.

[0051] En una otra forma de realización adicional, un análogo de nucleótido o equivalente de la invención comprende una sustitución de uno de los oxígenos que no forman puente en el enlace fosfodiéster. Esta modificación desestabiliza ligeramente el apareamiento de bases, pero añade resistencia significativa a la degradación de nucleasa. Un análogo de nucleótido o equivalente preferido comprende fosfortioato, fosfortioato quiral, fosforditioato, fosfotriéster, aminoalquilfosfotriéster, H-fosfonato, metil y otro alquil fosfonato entre los que se incluye 3'-alquileo fosfonato, 5'-alquileo fosfonato y fosfonato quiral, fosfinato, fosforamidato entre los que se incluye 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidato, tionofosforamidato, tionoalquilfosfonato, tionoalquilfosfotriéster, selenofosfato o boranofosfato.

[0052] Un análogo de nucleótido o equivalente preferido adicional de la invención comprende una o más fracciones de azúcar que son mono o disustituidas en la posición 2', 3' y/o 5' tales como un -OH; -F; alquilo, alqueno, alquino, alcarilo, alilo, arilo, o aralquilo (C1-C10) inferiores sustituidos o no sustituidos, lineales o ramificados, que se pueden interrumpir por uno o más heteroátomos; O-, S-, o N-alquilo; O-, S-, o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; O-, S-, o N-alilo; O-alquil-O-alquilo, -metoxi, -aminopropoxi; -aminoxi; metoxietoxi; -dimetilaminoetoxi; y -dimetilaminoetoxietoxi. La fracción de azúcar puede ser una piranososa o derivado de la misma, o una desoxipiranososa o derivado de la misma, preferiblemente una ribosa o un derivado de la misma, o una desoxirribosa o un derivado de la misma. Tales fracciones de azúcar derivadas preferidas comprenden ácido nucleico bloqueado (LNA), donde el átomo de carbono en 2' se enlaza al átomo de carbono en 3' o 4' del anillo de azúcar formando así una fracción de azúcar bicíclica. Un LNA preferido comprende ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-etileno (Morita *et al.* 2001. Nucleic Acid Res Supplement No.1: 241-242). Estas sustituciones vuelven el análogo de nucleótido o equivalente resistente a la RNasa H y a la nucleasa y aumentan la afinidad al ARN objetivo.

[0053] Se entiende por una persona experta que no es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido antisentido se modifiquen uniformemente. Además, más de uno de los análogos o equivalentes anteriormente mencionados se pueden incorporar en un oligonucleótido antisentido único o incluso en una posición única dentro de un oligonucleótido antisentido. En algunas formas de realización, un oligonucleótido antisentido de la invención tiene al menos dos tipos diferentes de análogos o equivalentes.

[0054] Un oligonucleótido antisentido preferido según la invención comprende un oligonucleótido antisentido 2'-O alquilfosfortioato, tal como ribosa 2'-O-metil modificada (ARN), ribosa 2'-O-etil modificada, ribosa 2'-O-propil modificada, y/o derivados sustituidos de estas modificaciones tales como derivados halogenados.

[0055] Un oligonucleótido antisentido más preferido según la invención consiste en ribosa 2'-O-metilfosfortioato.

[0056] Un equivalente funcional de una molécula de la invención o divulgación se puede definir como un oligonucleótido tal y como se define en este documento, donde una actividad de dicho equivalente funcional se retiene en al menos alguna medida. Preferiblemente, una actividad de dicho equivalente funcional induce el salto del exón 43, 46, 50, 51, 52, o 53 y proporciona una proteína distrofina funcional. Dicha actividad de dicho equivalente funcional se evalúa, por lo tanto, preferiblemente por detección de salto del exón 43, 46, 50, 51, 52, o 53 y cuantificando la cantidad de proteína distrofina funcional. Una distrofina funcional se define en este documento preferiblemente como una distrofina capaz de enlazarse a actina y a miembros del complejo de proteína DGC. La evaluación de dicha actividad de un oligonucleótido se hace preferiblemente por RT-PCR o por análisis de inmunofluorescencia o de transferencia Western. Dicha actividad se retiene preferiblemente en al menos alguna medida cuando representa al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 % o al menos el 80 % o al menos el 90 % o al menos el 95 % o más de la actividad correspondiente de dicho oligonucleótido del que se deriva el equivalente funcional. En toda esta solicitud, cuando se usa la palabra oligonucleótido, se puede sustituir por un equivalente funcional del mismo tal y como se define en este documento.

[0057] Se entenderá por una persona experta que oligonucleótidos antisentido diferentes se pueden combinar para el salto eficaz de cualquiera del exón 43, exón 46, exón 50, exón 51, exón 52 y/o exón 53 del pre-ARNm de DMD humano. Se abarca en la presente invención o divulgación el uso de uno, dos, tres, cuatro, cinco o más oligonucleótidos para el salto de uno de dichos exones (es decir, exón 43, 46, 50, 51, 52, o 53). También se abarca el uso de al menos dos oligonucleótidos para el salto de al menos dos de dichos exones. Preferiblemente se saltan dos de dichos exones. Más preferiblemente, estos dos exones son:

- 43 y 51, o
- 43 y 53, o
- 50 y 51, o

- 51 y 52, o
- 52 y 53.

5 La persona experta conocerá qué combinación de exones se prefiere saltarse dependiendo del tipo, el número y la ubicación de la mutación presente en un paciente con DMD o BMD.

10 [0058] Un oligonucleótido antisentido se puede enlazar a una fracción que mejora la absorción del oligonucleótido antisentido en las células, preferiblemente células musculares. Ejemplos de tales fracciones son colesterolos, carbohidratos, vitaminas, biotina, lípidos, fosfolípidos, péptidos que penetran en las células, entre los que se incluyen, pero de forma no limitativa, antenapedia, TAT, transportan y aminoácidos positivamente cargados tales como oligoarginina, poliarginina, oligolisina o polilisina, dominios de enlace a antígeno tales como proporcionados por un anticuerpo, un fragmento Fab de un anticuerpo, o un dominio de enlace a antígeno monocatenario tal como un dominio de enlace a antígeno de dominio único de camélido.

15 [0059] Un oligonucleótido antisentido preferido comprende un PMO enlazado a péptido.

20 [0060] Un oligonucleótido antisentido preferido que comprende uno o más análogos de nucleótido o equivalentes de la invención modula el empalme en una o más células musculares, incluidas células musculares cardíacas, tras la administración sistémica. En este aspecto, la administración sistémica de un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo de nucleótido o equivalente específico puede resultar en la selección como objetivo de un subconjunto de células musculares, mientras que un oligonucleótido antisentido que comprende un análogo de nucleótido o equivalente diferente puede resultar en la selección como objetivo de un subconjunto diferente de células musculares. Por lo tanto, en una forma de realización se prefiere usar una combinación de oligonucleótidos antisentido que comprende análogos de nucleótido o equivalentes diferentes para inducir el salto del exón 43, 46, 50, 51, 52, o 53 del pre-ARNm de DMD humano.

30 [0061] Una célula se puede proporcionar con una molécula capaz de interferir con secuencias esenciales que resultan en un salto altamente eficaz del exón 43, exón 46, exón 50, exón 51, exón 53 (según la divulgación) o exón 52 (según la invención) del pre-ARNm de DMD humano mediante la expresión de oligonucleótidos antisentido derivados de plásmido o la expresión vírica proporcionada por vectores basados en adenovirus o en virus adenoasociados. En una forma de realización preferida, se proporciona un vector de expresión basado en virus que incluye un casete de expresión que impulsa la expresión de una molécula como se identifica en este documento. La expresión se impulsa preferiblemente por un promotor de polimerasa III, tal como un promotor U1, U6, o U7 de ARN. Un músculo o célula miogénica se puede proporcionar con un plásmido para expresión de oligonucleótido antisentido proporcionando el plásmido en una solución acuosa. Alternativamente, un plásmido se puede proporcionar por transfección usando agentes de transfección conocidos tales como, por ejemplo, LipofectAMINE™ 2000 (Invitrogen) o polietilenimina (PEI; ExGen500 (MBI Fermentas)), o derivados de los mismos.

40 [0062] Un sistema de expresión de oligonucleótido antisentido preferido es un vector basado en virus asociado a adenovirus (AAV). Se han desarrollado vectores basados en AAV de cadena simple y doble que se pueden usar para la expresión prolongada de pequeñas secuencias de nucleótidos antisentido para saltar muy eficazmente el exón 43, 46, 50, 51, 52 o 53 del pre-ARNm de DMD.

45 [0063] Un vector basado en AAV preferido comprende un casete de expresión que se impulsa por un promotor de polimerasa III (Pol III). Un promotor Pol III preferido es, por ejemplo, un promotor U1, U6, o U7 de ARN.

50 [0064] La invención, por lo tanto, también proporciona un vector basado en virus, que comprende un casete de expresión impulsado por el promotor Pol III para la expresión de una secuencia antisentido de la invención para inducir el salto del 52 del pre-ARNm de DMD humano. Un vector basado en virus según la divulgación comprende un casete de expresión impulsado por el promotor Pol III para la expresión de una o más secuencias antisentido de la divulgación para inducir el salto del exón 43, exón 46, exón 50, exón 51 o exón 53 del pre-ARNm de DMD humano.

55 Composición farmacéutica

[0065] Si es necesario, una molécula o un vector que expresa un oligonucleótido antisentido de la invención se puede incorporar en una mezcla o composición farmacéuticamente activa añadiendo un portador farmacéuticamente aceptable.

60 [0066] Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención proporciona una composición, preferiblemente una composición farmacéutica que comprende una molécula que incluye un oligonucleótido antisentido según la invención, y/o un vector basado en virus que expresa la(s) secuencia(s) antisentido según la invención y un portador farmacéuticamente aceptable.

65

[0067] Una composición farmacéutica preferida comprende una molécula tal y como se define en este documento y/o un vector tal y como se define en este documento, y un portador o excipiente farmacéutico aceptable, opcionalmente combinados con una molécula y/o un vector tal y como se define en este documento que es capaz de inducir el salto del exón 51, 53, 55, 57, 59 o 69 del pre-ARNm del DMD. Las moléculas preferidas capaces de inducir el salto de cualquiera de estos exones se identifican en cualquiera de las tablas 1 a 7.

[0068] Los excipientes preferidos incluyen excipientes capaces de formar complejos, vesículas y/o liposomas que administren tal molécula tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido en un complejo o retenido en una vesícula o liposoma a través de una membrana celular. Muchos de estos excipientes se conocen en la técnica. Excipientes adecuados comprenden polietilenimina y derivados, o polímeros catiónicos similares, que incluyen copolímeros de polipropilenoimina o polietilenimina (PEC) y derivados, ExGen 500, anfifilos sintéticos (SAINT-18), lipofectin™, DOTAP y/o proteínas cápsidas víricas que son capaces de autoensamblarse en partículas que pueden administrar tal molécula, preferiblemente un oligonucleótido tal y como se define en este documento, a una célula, preferiblemente una célula muscular. Se ha mostrado que tales excipientes administran eficazmente ácidos nucleicos (oligonucleótido tal como antisentido) a una amplia variedad de células cultivadas, incluidas células musculares. Su alto potencial de transfección se combina con una toxicidad exceptuada de baja a moderada en cuanto a la supervivencia celular en general. La facilidad de modificación estructural se puede utilizar para permitir otras modificaciones y el análisis de sus características de transferencia de ácido nucleico (*in vivo*) adicionales y toxicidad.

[0069] La lipofectina representa un ejemplo de un agente de transfección liposómica. Consiste en dos componentes lipídicos, un lípido catiónico cloruro de N-[1-(2,3dioleoiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) (cp. DOTAP que es la sal de metilsulfato) y un lípido neutro dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE). El componente neutro media la liberación intracelular. Otro grupo de sistemas de administración son las nanopartículas poliméricas.

[0070] Los policationes tales como dietilaminoetilaminoetilo (DEAE)-dextrano, que son bien conocidas como reactivo de transfección de ADN, se pueden combinar con butilcianoacrilato (PBCA) y hexilcianoacrilato (PHCA) para formular nanopartículas catiónicas que pueden administrar una molécula o un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido, a través de las membranas celulares en las células.

[0071] Además de estos materiales de nanopartícula comunes, la protamina peptídica catiónica ofrece un enfoque alternativo para formular un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido tal como los coloides. Este sistema de nanopartículas coloidales puede formar las llamadas protículas, que se pueden preparar por un proceso de autoensamblaje simple para envasar y mediar la liberación intracelular de un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido. La persona experta puede seleccionar y adaptar cualquiera de los excipientes anteriores u otros excipientes alternativos y sistemas de administración disponibles comercialmente para envasar y administrar un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido para el uso en la presente invención para administrar dicho compuesto para el tratamiento de la distrofia muscular de Duchenne o distrofia muscular de Becker en humanos.

[0072] Además, un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido, podría enlazarse de manera covalente o de manera no covalente a un ligando de selección de objetivo diseñado específicamente para facilitar la absorción en la célula, citoplasma y/o su núcleo. Tal ligando podría comprender (i) un compuesto (que incluye, pero de forma no limitativa, estructuras (de tipo) peptídicas) que reconoce elementos específicos de la célula, tejido u órgano que facilitan la absorción celular y/o (ii) un compuesto químico capaz de facilitar la absorción en las células y/o la liberación intracelular de un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido de vesículas, por ejemplo, endosomas o lisosomas.

[0073] Por lo tanto, en una forma de realización preferida, un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido, se formula en un medicamento que se proporciona con al menos un excipiente y/o un ligando de selección de objetivo para la administración y/o un dispositivo de administración de dicho compuesto a una célula y/o que mejora su administración intracelular. Por consiguiente, la invención también abarca una composición farmacéuticamente aceptable que comprende un compuesto tal y como se define en este documento, preferiblemente un oligonucleótido, y que además comprende al menos un excipiente y/o un ligando de selección de objetivo para la administración y/o un dispositivo de administración de dicho compuesto a una célula y/o que mejora su administración intracelular.

Debe entenderse que una molécula o compuesto u oligonucleótido no se puede formular en una única composición o preparación. Dependiendo de su identidad, la persona experta conocerá qué tipo de formulación es la más apropiada para cada compuesto.

[0074] En una forma de realización preferida, se usa una concentración *in vitro* de una molécula o un oligonucleótido tal y como se define en este documento, que oscila entre 0,1 nM y 1 μ M. Más preferiblemente, la

concentración usada oscila entre 0,3 y 400 nM, aún más preferiblemente entre 1 y 200 nM. Una molécula o un oligonucleótido tal y como se define en este documento se puede usar en una dosis que oscila entre 0,1 y 20 mg/kg, preferiblemente entre 0,5 y 10 mg/kg. Si se usan varias moléculas u oligonucleótidos, estas concentraciones pueden referirse a la concentración total de oligonucleótidos o a la concentración de cada oligonucleótido adicionado. Los rangos de concentración de (de los) oligonucleótido(s) dados anteriormente son concentraciones preferidas para usos *in vitro* o *ex vivo*. La persona experta entenderá que dependiendo del (de los) oligonucleótido(s) usado(s), la célula objetivo que se va a tratar, el objetivo genético y sus niveles de expresión, el medio usado y las condiciones de transfección e incubación, la concentración del (de los) oligonucleótido(s) usado(s) puede variar adicionalmente y puede necesitar optimizarse adicionalmente.

[0075] Más preferiblemente, un compuesto, preferiblemente un oligonucleótido, que se va a usar en la invención o divulgación para prevenir, tratar la DMD o la BMD se produce sintéticamente y se administra directamente a una célula, un tejido, un órgano y/o pacientes en la forma formulada en una composición o preparación farmacéuticamente aceptable. La administración de una composición farmacéutica al sujeto se realiza preferiblemente mediante una o más inyecciones parenterales, por ejemplo, administraciones intravenosas y/o subcutáneas y/o intramusculares y/o intratecales y/o intraventriculares, preferiblemente inyecciones, en un sitio o en múltiples sitios en el cuerpo humano.

[0076] Un oligonucleótido preferido tal y como se define en este documento que comprende opcionalmente uno o más análogos de nucleótido o equivalentes de la invención o divulgación modula el empalme en una o más células musculares, incluidas las células musculares cardíacas, tras la administración sistémica. En este aspecto, la administración sistémica de un oligonucleótido que comprende un análogo de nucleótido específico o equivalente puede resultar en la selección como objetivo de un subconjunto de células musculares, mientras que un oligonucleótido que comprende un análogo de nucleótido o equivalente diferente puede resultar en la selección como objetivo de un subconjunto diferente de células musculares.

[0077] En este aspecto, la administración sistémica de un oligonucleótido que comprende un análogo de nucleótido o equivalente específico puede resultar en la selección como objetivo de un subconjunto de células musculares, mientras que un oligonucleótido que comprende un análogo de nucleótido o equivalente diferente puede resultar en la selección como objetivo de un subconjunto diferente de células musculares. Por lo tanto, en esta forma de realización, se prefiere usar una combinación de oligonucleótidos que comprende diferentes análogos de nucleótido o equivalentes para modular el empalme del ARNm de DMD en al menos un tipo de células musculares.

[0078] En una forma de realización preferida de la invención, se proporciona una molécula o un vector basado en virus para el uso como un medicamento, preferiblemente para modular el empalme del pre-ARNm de DMD, más preferiblemente para promover o inducir el salto del exón 52 como se identifica en este documento. En una forma de realización preferida de la divulgación, se proporciona una molécula o un vector basado en virus para el uso como un medicamento, preferiblemente para modular el empalme del pre-ARNm de DMD, más preferiblemente para promover o inducir el salto de cualquiera de los exones 43, 46, 50, 51 y 53 como se identifica en este documento.

Uso

[0079] En un otro aspecto adicional, la invención proporciona el uso de un oligonucleótido o molécula antisentido según la invención, y/o un vector basado en virus que expresa una secuencia antisentido según la invención y/o una composición farmacéutica, para modular el empalme del pre-ARNm de DMD. El empalme se modula preferiblemente en una célula miogénica humana o célula muscular *in vitro*. Más preferido es que el empalme se module en una célula muscular humana *in vivo*. Por consiguiente, la invención se refiere además al uso de la molécula tal y como se define en este documento y/o el vector tal y como se define en este documento y/o la composición farmacéutica tal y como se define en este documento para modular el empalme del pre-ARNm de DMD o para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con DMD o BMD.

[0080] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos después de la palabra se incluyen, pero que los elementos no mencionados específicamente no se excluyen. Además, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en" y significa que una molécula o un vector basado en virus o una composición tal y como se define en este documento puede comprender componente(s) adicional(es) a aquellos identificados específicamente, donde dicho(s) componente(s) adicional(es) no alteran la característica única de la invención. Además, la referencia a un elemento con el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que más de uno del elemento estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que allí sea uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", por lo tanto, significa normalmente "al menos uno/a". Cada forma de realización como se identifica en este documento se puede combinar a menos que se indique lo contrario.

[0081] Los ejemplos siguientes se ofrecen solo para fines ilustrativos y no se destinan para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Ejemplos

5

Ejemplos 1-4

Materiales y métodos

10 [0082] El diseño de AON se basó (parcialmente) en el solapamiento de estructuras secundarias abiertas del ARN del exón objetivo como predicho por el programa m-fold, en sitios de enlace de proteína SR putativos (parcialmente) superpuestos como predicho por el software ESE-finder. Los AON se sintetizaron por Prosensa Therapeutics B.V. (Leiden, Países Bajos), y contienen esqueletos de ARN de 2'-O-metil y fosforotioato en toda su longitud (PS).

15

Cultivo de tejido, transfección y análisis RT-PCR

[0083] Los cultivos de miotubo derivados a partir de un individuo sano ("control humano") (ejemplos 1, 3, y 4; salto del exón 43, 50, 52) o un paciente con DMD que lleva una deleción del exón 45 (ejemplo 2, salto del exón 46) se procesaron como se ha descrito previamente (Aartsma-Rus *et al.*, *Neuromuscul. Disord.* 2002; 12: S71-77 y *Hum Mol Genet* 2003; 12(8): 907-14). Para el cribado de AON, se transfectaron cultivos de miotubo con 50 nM y 150 nM (ejemplo 2), 200 nM y 500 nM (ejemplo 4) o solo 500 nM (ejemplos 1 y 3) de cada AON. Se usó el reactivo de transfección UNIFectylin (Prosensa Therapeutics BV, Países Bajos), con 2 µl de UNIFectylin por µg de AON. Las eficacias del salto de exón se determinaron por análisis RT-PCR anidada utilizando cebadores en los exones que flanquean los exones objetivos (43, 46, 50, 51, 52, o 53). Se aislaron fragmentos de PCR a partir de geles de agarosa para la verificación de secuencia. Para la cuantificación, se analizaron los productos de PCR utilizando el DNA 1000 LabChips Kit en el bioanalizador Agilent 2100a (Agilent Technologies, EE. UU.).

25

Resultados

30

Salto del exón 43 de DMD.

[0084] Una serie de secuencias de dirección de AON dentro del exón 43 se diseñaron y transfectaron en los cultivos de miotubo de control sano. Los análisis de secuencias y de RT-PCR posteriores de ARN aislado demostraron que casi todos los AON dirigidos a una extensión de nucleótido continua dentro del exón 43 definida en este documento como la SEQ ID N.º 2 fueron realmente capaces de inducir el salto del exón 43. PS237 (SEQ ID N.º: 65) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 43 (hasta el 66 %) a 500 nM, como se muestra en la figura 1. Para comparación, también se muestran PS238 y PS240, que inducen niveles de salto del exón 43 de hasta el 13 % y el 36 % respectivamente (figura 1). El salto preciso del exón 43 se confirmó mediante análisis de secuencias de los nuevos fragmentos de transcripción más pequeños. No se observó salto del exón 43 en células no tratadas (NT).

35

40

Salto del exón 46 de DMD.

[0085] Una serie de secuencias de dirección de AON dentro del exón 46 se diseñaron y transfectaron en los cultivos de miotubo derivados a partir de un paciente con DMD que lleva una deleción del exón 45 en el gen de DMD. Para pacientes con tal mutación, el salto del exón 46 inducido por antisentido induciría la síntesis de una nueva proteína distrofina de tipo BMD que puede aliviar realmente uno o más síntomas de la enfermedad. Los análisis de secuencias y de RT-PCR posteriores de ARN aislado demostraron que casi todos los AON dirigidos a una extensión de nucleótido continua dentro del exón 46 definida en este documento como la SEQ ID N.º 3 fueron realmente capaces de inducir el salto del exón 46, incluso en concentraciones de AON relativamente bajas de 50 nM. PS182 (SEQ ID N.º: 117) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 46 (hasta el 50 % a 50 nM y el 74 % a 150 nM), como se muestra en la figura 2. Para comparación, también se muestran PS177, PS179, y PS181, que inducen niveles de salto del exón 46 de hasta el 55 %, el 58 % y el 42 % respectivamente a 150 nM (figura 2). El salto preciso del exón 46 se confirmó mediante análisis de secuencias de los nuevos fragmentos de transcripción más pequeños. No se observó salto del exón 46 en células no tratadas (NT).

50

55

Salto del exón 50 de DMD.

60

[0086] Una serie de secuencias de dirección de AON dentro del exón 50 se diseñaron y transfectaron en los cultivos de miotubo de control sano. Los análisis de secuencias y de RT-PCR posteriores de ARN aislado demostraron que casi todos los AON dirigidos a una extensión de nucleótido continua dentro del exón 50 definida en este documento como la SEQ ID N.º 4 fueron realmente capaces de inducir el salto del exón 50. PS248 (SEQ ID N.º: 127) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 50 (hasta el 35 % a 500 nM), como se muestra en figura 3. Para comparación, también se muestran PS245, PS246, y PS247, que inducen niveles

65

de salto del exón 50 de hasta el 14-16 % a 500 nM (figura 3). El salto preciso del exón 50 se confirmó mediante el análisis de secuencias de nuevos fragmentos de transcripción más pequeños. No se observó salto del exón 50 en células no tratadas (NT).

5 Salto del exón 51 de DMD.

[0087] Una serie de secuencias de dirección de AON dentro del exón 51 se diseñaron y transfectaron en los cultivos de miotubo de control sano. Los análisis de secuencias y de RT-PCR posteriores de ARN aislado demostraron que casi todos los AON dirigidos a una extensión de nucleótido continua dentro del exón 51 definida en este documento como la SEQ ID N.º 5 fueron realmente capaces de inducir el salto del exón 51. El AON con la SEQ ID N.º 180 indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 51 (no mostrado).

Salto del exón 52 de DMD.

15 [0088] Una serie de secuencias de dirección de AON dentro del exón 52 se diseñaron y transfectaron en los cultivos de miotubo de control sano. Los análisis de secuencias y de RT-PCR posteriores de ARN aislado demostraron que casi todos los AON dirigidos a una extensión de nucleótido continua dentro del exón 52 definida en este documento como la SEQ ID N.º 6 fueron realmente capaces de inducir el salto del exón 52. PS236 (SEQ ID N.º: 299) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 52 (hasta el 88 % a 200 nM y el 91 % a 500 nM), como se muestra en la figura 4. Para comparación, también se muestran PS232 y AON 52-1 (publicado previamente por Aartsma-Rus *et al.* Oligonucleotides 2005), que inducen el salto del exón 52 en niveles de hasta el 59 % y el 10 % respectivamente cuando se aplican a 500 nM (figura 4). El salto preciso del exón 52 se confirmó mediante análisis de secuencias de los nuevos fragmentos de transcripción más pequeños. No se observó salto del exón 52 en células no tratadas (NT).

25 Salto del exón 53 de DMD.

[0089] Una serie de secuencias de dirección de AON dentro del exón 53 se diseñaron y transfectaron en los cultivos de miotubo de control sano. Los análisis de secuencias y de RT-PCR posteriores de ARN aislado demostraron que casi todos los AON dirigidos a una extensión de nucleótido continua dentro del exón 53 definida en este documento como la SEQ ID N.º 7 fueron realmente capaces de inducir el salto del exón 53. El AON con la SEQ ID N.º 328 indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 53 (no mostrado).

35 Listado de secuencias:

Secuencia de aminoácidos del gen de DMD

[0090]

40 **SEQ ID N.º 1:**

MLWWEVEDCYEREDVQKKTFTKWVNAQFSKFGKQHIEENLFSDLQDGRRLDLLEGLTGQKL
PKEKGSTRVHALNNVNKALRVLQNNNVDLVNIGSTDIVDGNHKLTLGLIWNILHWQVKNVMK
NIMAGLQQTNSEKILLSWVRQSTRNYPQVNVINFTTSWSDGLALNALIHSHRPDLFDWNSVVCQ
QSATQRLEHAFNIARYQLGIEKLLDPEDVDTTYPKKSILMYITSLFQVLPQQVSIEAIQEVEMLP
RPPKVTKEEHFQLHHQMHSQQITVSLAQGYERTSSPKPRFKSYAYTQAAVTTSDPTRSPFPSQ
HLEAPEDKSFSSLMESEVNLDRYQTALIEVLSWLLSAEDTLQAQGEISNDVEVVKDQFHTHEG
YMMDLTAHQGRVGNILQLGSKLIGTGKLESEDETEVQEQMNLNSRWECLRVASMEKQSNLH
RVLMDLQNKELNDWLTKEERTRKMEEEEPLGPDLEDLKRQVQHKVLQEDLEQEQRVN
SLTHMVVVDESSGDHATAALEEQKVLGDRWANICRWTEDRWVLLQDILLKWQRLTEEQCL
FSAWLSEKEDAVNKIHTTGFKDQNEMLSSLQKLAVLKADLEKKKQSMGKLYSLKQDLLSTLKN
KSVTQKTEAWLDFARCWDNLVQKLEKSTAQISQAVTTTTQPSLTQTTVMETVTTVTREQILV
KHAQEELPPPPQKKRQITVDSEIRKRLDVIDITELHSWITRSEAVLQSPEFAIFRKEGNFSDLKEK
VNAIEREKAIEKFRKLQDASRSAQALVEQMVNEGVNADSIKQASEQLNSRWIEFCQLLSERLNW
LEYQNNIAFYNLQQLQEQMTTAEENWLKIQPTTPTSEPTAIKSQLKICKDEVNRLSGLQPQIERLK
IQSIALKEKGQPMFLDADFVAFTNHFQVFSQVQAREKELQTFIDTLPPMRYQETMSAIRTWV
QQSETKLSIPQLSVTDYEIMEQRLGELQALQSSLQEQSGLYYLSTTVKEMSKKAPSEISRKYQS
EFEIEGRWKKLSSQLVEHCQKLEEQMNKLRKIQNHIQTLKKWMAEVDVFLKEEWPALGDSEI
LKKQLKQCRLLVSDIQTIPSLNSVNEGGQKIKNEAEPEFASRLETELTELKELNTQWDHMCQQVYA
RKEALGGLEKTVSLQKDLSEMHEWMTQAEEEYLERDFEYKTPDELQKAVEEMKRAKEEAQQ
KEAKVKLLTESVNSVIAQAPPVAQEALKKELETLTNYQWLCRNLGKCKTLEEVWACWHELL
SYLEKANKWLNVEFKLKTENIPGGAEIESEVLDLENLMRHSNPNQIRILAQTLTDGGVM
DELINEELETNRSRWRELHEEAARRQKLEEQSIQSAQETEKSLHLIQESLTFIDKQLAAYIADKVD
AAQMPQEAQKIQSDLTSHEISLEEMKKNQKQKAAQRVLSQIDVAQKKLQDVSMKFRFLQKPA
NFEQRLQESKMILDEVKMHLPALETKSVEQEVVQSQLNHCVNLYKSLSEVKSEVEMVIKTGRQI
VQKKQTENPKELDERVTALKLHYNELGAKVTERKQKLEKCLKLSRKMREMNVLTEWLAAT
DMELTKRSAVEGMPNSLDSEVAWGKATQKEIEKQKVHLKSITEVGEALKTVLGKKTLEVDKL
SLLNSNWIAVTSRAEEWLNLLLEYQKHMETFDQNVHDITKWIIQADTLLDESEKPKQKEDVL
KRLKAELNDIRPKVDSTRDQAANLMANRGDHCRLVEPQISELNHRFAAISHRIKTGKASIPLKE
LEQFNSDIQKLEPLEAEIQQGVNLKEEDFNKDMNEDNEGTVKELLQRGDNLQQRITDERKREEI
KIKQQLLQTKHNALKDLRSQRRKKALEISHQWYQYKRQADDLLKCLDDIEKKLASLPEPRDER
KIKEIDRELQKKEELNAVRRQAEGLSGDGAAMAVEPTQIQLSKRWREIESKFAQFRRLNFAQIH
TVREETMMVMTEDMPLISYVPSTYLTEITHVSQALLEVEQLLNAPDLCAKDFEDLFKQEESELK
NIKDSLQSSGRIDIIHKKTAALQSATPVERVKLQEALSQDFQWEKVNKMYKDRQGRFDRSV
EKWRRFHDIKIFNQWLTEAEQFLRKTQIPENWEHAKYKWYLKELQDGIGRQRTVVRTLNATG

EIIHQSSKTDASILQEKLGSNLRWQEVCKQLSDRKKRLEEQKNILSEFQRDLNEFVLWLEEAD
NIASIPLEPGKEQQLKEKLEQVKLLVEELPLRQGIKQLNETGGPVLVSAPISPEEQDKLENKQ
TNLQWIKVSRALPEKQGEIEAQIKDLGQLEKKLEDLEEQLNHLLWLSPIRNQLEIYNQPNQEGP
FDVQETEIAVQAKQPDVEEILSKGQHLYKEKPATQPVKRKLEDLSSEWKAVNRLQELRAKQ
DLAPGLTTIGASPTQTVTLVTQPVVTKETAISKLEMPSSLMLEVPALADFNRAWTELTDWLSLL
DQVIKSQRVMVGDLEDINEMIIKQKATMQDLEQRRPQLEELITAAQNLKNKTSNQEARTIITDRI
ERIQNQWDEVQEHLQNRQQLNEMLKDSTQWLEAKEEAEQVLGQARAKLESWKEGPYTVDAI
QKKITETKQLAKDLRQWQTNVDVANDLALKLLRDYSADDTRKVMHMITENINASWRSIHKRVS
REAALETHRLLQFPDLKFLAWLTAETTANVLQDATRKERLLEDKGVKELMKQWQDL
QGEIEAHTDVYHNLDENSQKILRSLEGSDDAVLLQRRLDNMNFKWSELRKKSLNIRSHLEASSD
QWKRLHLSLQELLVWLQKDDLSRQAPIGGDFPAVQKQNDVHRAFKRELKTKPEVIMSTLET
VRIFLTEQPLEGLEKLYQEPRELPEERAQNVTRLLRKQAEVNTTEWEKLNLSADWQRKIDET
LERLQELQEATDELKLRQAEVIKGSWQPVGDLLIDSLQDHLEKVKALRGEIAPLKENVSHVN
DLARQLTTLGIQLSPYNLSTLEDLNTRWKLQVAVEDRVRQLHEAHRDFGPASQHFLSTSVQGP
WERAISPKNVPYYINHETQTTTCWDHPKMTELYQSLADLNNVRFSAYRTAMKLRRLQKALCLDL
LSLSAACDALDQHNLKQNDQPMQDILQIINCLTTIYDRLEQEHNNLVNPLCVDMLCNWLLNVY
DTGRTGRIRVLSFKTGIIISLCKAHLKEDKYRYLFKQVASSTGFCDQRRGLLLHDSIQIPRQLGEVA
SFGGSNIEPSVRSCFQFANNKPEIEAALFLDWMRLEPQSMVWLPVLRVAAAETAQHAKQKCNIC
KECPIIGFRYRSLKHFNYDICQSCFFSGRVAKGHKMHYPMVEYCTPTTSGEDVRDFAKVLKKNF
RTKRYFAKHPRMGYLPVQTVLEGDNMETPVTLINFWPVSAPASSPQLSHDDTHSRIEHYASRL
AEMENSNGSYLNDSSIPNESIDDEHLLIQHYCQSLNQDSPQSQRSPAQILISLESEERGELERILAD
LEEENRNLQAEYDRLKQQHEHKGLSPLSPPEMMPSTPQSPRDAELIAEAKLLRQHKGRLARM
QILEDHKNQLESQHLRLRQLLEQPQAEAKVNGTTVSSPSTSLQRS DSSQPMLLRVVGSQTSDSM
GEEDLLSPPQDSTGLEEVMEQLNNSFPSSRGRNTPGKPMREDTM

SEQ ID N.º 2 (exón 43):

AGAUAGUCUACAACAAAGCUCAGGUCGGAUUGACAUAUUAUCAUAGCAAGAAGACAGCAG
CAUUGCAAAGUGCAACGCCUGUGG

5

SEQ ID N.º 3 (exón 46):

UUAUGGUUGGAGGAAGCAGAUACAUAUUGCUAGUAUCCACUUGAACCUGGAAAAGAGCA
GCAACUAAAAGAAAAGC

SEQ ID N.º 4 (exón 50):

'GGCGGTAAACCGUUUACUUCAAGAGCUGAGGGCAAAGCAGCCUG ACCUAGC
UCCUGGACUGACCACUAUUGG

10

SEQ ID N.º 5 (exón 51):

CUCCUACUCAGACUGUUACUCUGGUGACACAACCUGUGGUUACUAAGGAAACUGCCAUC
UCCAACUAGAAAUGCCAUCUCCUUGAUGUUGGAGGUAC

15

SEQ ID N.º 6 (exón 52):

AUGCAGGAUUUGGAACAGAGGCGUCCCCAGUUGGAAGAACUCAUUACCGCUGCCCCAAA
 UUUGAAAAA CAAGACCAGCAAUCAAGAGGCU

SEQ ID N.º 7 (exón 53):

AAAUGUAAAAGGAUUCAACACAAUGGCUGGAAGCUAAGGAAGAAGCUGAGCAGGUCUUA
 GGACAGGCCAGAG

5

Tabla 1: oligonucleótidos para el salto del exón 43 del gen de DMD

SEQ ID N.º 8	CCACAGGCGUUGCACUUUGCAAUGC	SEQ ID N.º 39	UCUUCUUGCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 9	CACAGGCGUUGCACUUUGCAAUGC	SEQ ID N.º 40	CUUCUUGCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 10	ACAGGCGUUGCACUUUGCAAUGCUG	SEQ ID N.º 41	UUCUUGCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 11	CAGGCGUUGCACUUUGCAAUGCUGC	SEQ ID N.º 42	UCUUGCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 12	AGGCGUUGCACUUUGCAAUGCUGCU	SEQ ID N.º 43	CUUGCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 13	GGCGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUG	SEQ ID N.º 44	UUGCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 14	GCGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUGU	SEQ ID N.º 45	UGCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 15	CGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUGUC	SEQ ID N.º 46	GCUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 16 PS240	CGUUGCACUUUGCAAUGCUGCUG	SEQ ID N.º 47	CUAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 17	GUUGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCU	SEQ ID N.º 48	UAUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 18	UUGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCUU	SEQ ID N.º 49	AUGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 19	UGCACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUC	SEQ ID N.º 50	UGAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 20	GCACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCU	SEQ ID N.º 51	GAAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 21	CACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUU	SEQ ID N.º 52	AAUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 22	ACUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUG	SEQ ID N.º 53	AUAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 23	CUUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGC	SEQ ID N.º 54	UAAUGUCAAU
SEQ ID N.º 24	UUUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGCU	SEQ ID N.º 55	AAUGUCAAU
SEQ ID N.º 25	UUGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGCUA	SEQ ID N.º 56	AUGUCAAU
SEQ ID N.º 26	UGCAAUGCUGCUGUCUUCUUGCUAU	SEQ ID N.º 57	UGUCAAU
SEQ ID N.º 27	GCAAUGCUGCUGUCUUCUUGCUAUG	SEQ ID N.º 58	GUCAAU

SEQ ID N.º 28	CAAUGCUGCUGUCUUCUUGCUAUGA	SEQ ID N.º 59	UCAAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUA
SEQ ID N.º 29	AAUGCUGCUGUCUUCUUGCUAUGAA	SEQ ID N.º 60	CAAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAG
SEQ ID N.º 30	AUGCUGCUGUCUUCUUGCUAUGAAU	SEQ ID N.º 61	AAUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGA
SEQ ID N.º 31	UGCUGCUGUCUUCUUGCUAUGAAUA	SEQ ID N.º 62	AUCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGAC
SEQ ID N.º 32	GCUGCUGUCUUCUUGCUAUGAAUAA	SEQ ID N.º 63	UCCGACCUGAGCUUUGUUGUAGACU
SEQ ID N.º 33	CUGCUGUCUUCUUGCUAUGAAUAAU	SEQ ID N.º 64	CCGACCUGAGCUUUGUUGUAGACUA
SEQ ID N.º 34	UGCUGUCUUCUUGCUAUGAAUAAU G	SEQ ID N.º 65 PS237	CGACCUGAGCUUUGUUGUAG
SEQ ID N.º 35	GCUGUCUUCUUGCUAUGAAUAAUG U	SEQ ID N.º 66 PS238	CGACCUGAGCUUUGUUGUAGACUAU
SEQ ID N.º 36	CUGUCUUCUUGCUAUGAAUAAUGUC	SEQ ID N.º 67	GACCUGAGCUUUGUUGUAGACUAUC
SEQ ID N.º 37	UGUCUUCUUGCUAUGAAUAAUGUC A	SEQ ID N.º 68	ACCUGAGCUUUGUUGUAGACUAUCA
SEQ ID N.º 38	GUCUUCUUGCUAUGAAUAAUGUCA A	SEQ ID N.º 69	CCUGA GCUUU GUUGU AGACU AUC

Tabla 2: oligonucleótidos para el salto del exón 46 del gen de DMD

SEQ ID N.º 70 PS179	GCUUUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUU	SEQ ID N.º 97	CCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAA
SEQ ID N.º 71	CUUUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUU	SEQ ID N.º 98	CAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAU
SEQ ID N.º 72	UUUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 99	AGGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUG
SEQ ID N.º 73	UUUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 100	GGUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGU
SEQ ID N.º 74	UUCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 101	GUUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUU
SEQ ID N.º 75	UCUUUUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 102	UUCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUA
SEQ ID N.º 76	CUUUUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 103	UCAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUU
SEQ ID N.º 77	UUUUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 104	CAAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUUC
SEQ ID N.º 78	UUUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 105	AAGUGGGAUACUAGCAAUGUUUUCU
SEQ ID N.º 79	UUAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 106	AGUGGGAUACUAGCAAUGUUUUCUG
SEQ ID N.º 80	UAGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 107	GUGGGAUACUAGCAAUGUUUUCUGC
SEQ ID N.º 81	AGUUGCUGCUCUUUUC	SEQ ID N.º 108	UGGGAUACUAGCAAUGUUUUCUGCU

SEQ ID N.º 82	GUUGCUGCUCUUUCCAGGUUCAAG	SEQ ID N.º 109	GGGAUACUAGCAAUGUUAUCUGCUU
SEQ ID N.º 83	UUGCUGCUCUUUCCAGGUUCAAGU	SEQ ID N.º 110 PS181	GGAUACUAGCAAUGUUAUCUGCUUC
SEQ ID N.º 84	UGCUGCUCUUUCCAGGUUCAAGUG	SEQ ID N.º 111	GAUACUAGCAAUGUUAUCUGCUUCC
SEQ ID N.º 85	GCUGCUCUUUCCAGGUUCAAGUGG	SEQ ID N.º 112	AUACUAGCAAUGUUAUCUGCUUCCU
SEQ ID N.º 86	CUGCUCUUUCCAGGUUCAAGUGGG	SEQ ID N.º 113	UACUAGCAAUGUUAUCUGCUUCCUC
SEQ ID N.º 87	UGCUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGA	SEQ ID N.º 114	ACUAGCAAUGUUAUCUGCUUCCUCC
SEQ ID N.º 88	GCUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGAC	SEQ ID N.º 115	CUAGCAAUGUUAUCUGCUUCCUCCA
SEQ ID N.º 89	CUCUUUCCAGGUUCAAGUGGGUAU	SEQ ID N.º 116	UAGCAAUGUUAUCUGCUUCCUCCAA
SEQ ID N.º 90	UCUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUAC	SEQ ID N.º 117 PS182	AGCAAUGUUAUCUGCUUCCUCCAAC
SEQ ID N.º 91 PS177	UCUUUCCAGGUUCAAGUGG	SEQ ID N.º 118	GCAAUGUUAUCUGCUUCCUCCAACC
SEQ ID N.º 92	CUUUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACU	SEQ ID N.º 119	CAAUGUUAUCUGCUUCCUCCAACCA
SEQ ID N.º 93	UUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACU A	SEQ ID N.º 120	AAUGUUAUCUGCUUCCUCCAACCAU
SEQ ID N.º 94	UUUCCAGGUUCAAGUGGGAUACUA G	SEQ ID N.º 121	AUGUUAUCUGCUUCCUCCAACCAUA
SEQ ID N.º 95	UCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGC	SEQ ID N.º 122	UGUUAUCUGCUUCCUCCAACCAUAA
SEQ ID N.º 96	UCCAGGUUCAAGUGGGAUACUAGCA		

Tabla 3: oligonucleótidos para el salto del exón 50 del gen de DMD

SEQ ID N.º 123	CCAAUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUA	SEQ ID N.º 146	CUAGGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAG
SEQ ID N.º 124	CAAUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAG	SEQ ID N.º 147	UAGGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGC
SEQ ID N.º 125	AAUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGG	SEQ ID N.º 148	AGGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCU
SEQ ID N.º 126	AUAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGU	SEQ ID N.º 149	GGUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUC
SEQ ID N.º 127 PS248	AUAGUGGUCAGUCCAGGAGCU	SEQ ID N.º 150	GUCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCU
SEQ ID N.º 128	UAGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUC	SEQ ID N.º 151	UCAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUU
SEQ ID N.º 129	AGUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCA	SEQ ID N.º 152	CAGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUG

SEQ ID N.º 130	GUGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCAG	SEQ ID N.º 153	AGGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGA
SEQ ID N.º 131	UGGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCAGG	SEQ ID N.º 154	GGCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAA
SEQ ID N.º 132	GGUCAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGC	SEQ ID N.º 155	GCUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAG
SEQ ID N.º 133	GUCAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCU	SEQ ID N.º 156	CUGCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGU
SEQ ID N.º 134	UCAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUG	SEQ ID N.º 157	UGCUIUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUA
SEQ ID N.º 135	CAGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGC	SEQ ID N.º 158	GCUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAA
SEQ ID N.º 136	AGUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCU	SEQ ID N.º 159	CUUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAA
SEQ ID N.º 137	GUCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUU	SEQ ID N.º 160	UUUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAAC
SEQ ID N.º 138	UCCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUU	SEQ ID N.º 161	UUGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAACG
SEQ ID N.º 139	CCAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUG	SEQ ID N.º 162	UGCCCUCAGCUCUUGAAGUAAACGG
SEQ ID N.º 140	CAGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGC	SEQ ID N.º 163	GCCCUCAGCUCUUGAAGUAAACGGU
SEQ ID N.º 141	AGGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCC	SEQ ID N.º 164	CCCUCAGCUCUUGAAGUAAACGGUU
SEQ ID N.º 142	GGAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCCC	SEQ ID N.º 165 PS246	CCUCAGCUCUUGAAGUAAAC
SEQ ID N.º 143	GAGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCCCU	SEQ ID N.º 166 PS247	CCUCAGCUCUUGAAGUAAACG
SEQ ID N.º 144	AGCUAGGUCAGGCUGCUUUGCCCUC	SEQ ID N.º 167 PS245	CUCAGCUCUUGAAGUAAACG
SEQ ID N.º 145	GCUAGGUCAGGCUGCUUUGCCCUC	SEQ ID N.º 529	CCUCAGCUCUUGAAGUAAACGGUUU
SEQ ID N.º 530	CUCAGCUCUUGAAGUAAACGGUUUA	SEQ ID N.º 531	UCAGCUCUUGAAGUAAACGGUUUAC
SEQ ID N.º 532	CAGCUCUUGAAGUAAACGGUUUACC	SEQ ID N.º 533	AGCUCUUGAAGUAAACGGUUUACCG
SEQ ID N.º 534	GCUCUUGAAGUAAACGGUUUACCGC	SEQ ID N.º 535	CUCUUGAAGUAAACGGUUUACCGCC

Tabla 4: oligonucleótidos para el salto del exón 51 del gen de DMD

SEQ ID N.º 168	GUACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGG	SEQ ID N.º 205	GAGAUGGCAGUUUCCUUGUAACCA
SEQ ID N.º 169	UACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGC	SEQ ID N.º 206	AGAUGGCAGUUUCCUUGUAACCAC
SEQ ID N.º 170	ACCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCA	SEQ ID N.º 207	GAUGGCAGUUUCCUUGUAACCACA
SEQ ID N.º 171	CCUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAU	SEQ ID N.º 208	AUGGCAGUUUCCUUGUAACCACAG

ES 2 692 886 T3

SEQ ID N.º 172	CUCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUU	SEQ ID N.º 209	UGGCAGUUUCCUUAGUAACCACAGG
SEQ ID N.º 173	UCCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUU	SEQ ID N.º 210	GGCAGUUUCCUUAGUAACCACAGGU
SEQ ID N.º 174	CCAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUC	SEQ ID N.º 211	GCAGUUUCCUUAGUAACCACAGGUU
SEQ ID N.º 175	CAACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCU	SEQ ID N.º 212	CAGUUUCCUUAGUAACCACAGGUUG
SEQ ID N.º 176	AACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUA	SEQ ID N.º 213	AGUUUCCUUAGUAACCACAGGUUGU
SEQ ID N.º 177	ACAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAG	SEQ ID N.º 214	GUUUCCUUAGUAACCACAGGUUGUG
SEQ ID N.º 178	CAUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGU	SEQ ID N.º 215	UUUCCUUAGUAACCACAGGUUGUGU
SEQ ID N.º 179	AUCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUU	SEQ ID N.º 216	UUCUUAGUAACCACAGGUUGUGUC
SEQ ID N.º 180	UCAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUU	SEQ ID N.º 217	UCCUUAGUAACCACAGGUUGUGUCA
SEQ ID N.º 181	CAAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUG	SEQ ID N.º 218	CCUUAGUAACCACAGGUUGUGUCAC
SEQ ID N.º 182	AAGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGG	SEQ ID N.º 219	CUUAGUAACCACAGGUUGUGUCACC
SEQ ID N.º 183	AGGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGA	SEQ ID N.º 220	UUAGUAACCACAGGUUGUGUCACCA
SEQ ID N.º 184	GGAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAG	SEQ ID N.º 221	UAGUAACCACAGGUUGUGUCACCAG
SEQ ID N.º 185	GAAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGA	SEQ ID N.º 222	AGUAACCACAGGUUGUGUCACCAGA
SEQ ID N.º 186	AAGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAU	SEQ ID N.º 223	GUAACCACAGGUUGUGUCACCAGAG
SEQ ID N.º 187	AGAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUG	SEQ ID N.º 224	UAACCACAGGUUGUGUCACCAGAGU
SEQ ID N.º 188	GAUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGG	SEQ ID N.º 225	AACCACAGGUUGUGUCACCAGAGUA
SEQ ID N.º 189	AUGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGC	SEQ ID N.º 226	ACCACAGGUUGUGUCACCAGAGUAA
SEQ ID N.º 190	UGGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCA	SEQ ID N.º 227	CCACAGGUUGUGUCACCAGAGUAAC
SEQ ID N.º 191	GGCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAG	SEQ ID N.º 228	CACAGGUUGUGUCACCAGAGUAACA
SEQ ID N.º 192	GCAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGU	SEQ ID N.º 229	ACAGGUUGUGUCACCAGAGUAACAG
SEQ ID N.º 193	CAUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUU	SEQ ID N.º 230	CAGGUUGUGUCACCAGAGUAACAGU
SEQ ID N.º 194	AUUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUU	SEQ ID N.º 231	AGGUUGUGUCACCAGAGUAACAGUC
SEQ ID N.º 195	UUUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUC	SEQ ID N.º 232	GGUUGUGUCACCAGAGUAACAGUCU
SEQ ID N.º 196	UUCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCC	SEQ ID N.º 233	GUUGUGUCACCAGAGUAACAGUCUG

SEQ ID N.º 197	UCUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCU	SEQ ID N.º 234	UUGUGUCACCAGAGUAACAGUCUGA
SEQ ID N.º 198	CUAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUU	SEQ ID N.º 235	UGUGUCACCAGAGUAACAGUCUGAG
SEQ ID N.º 199	UAGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUUA	SEQ ID N.º 236	GUGUCACCAGAGUAACAGUCUGAGU
SEQ ID N.º 200	AGUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUAG	SEQ ID N.º 237	UGUCACCAGAGUAACAGUCUGAGUA
SEQ ID N.º 201	GUUUGGAGAUGGCAGUUUCCUAGU	SEQ ID N.º 238	GUCACCAGAGUAACAGUCUGAGUAG
SEQ ID N.º 202	UUUGGAGAUGGCAGUUUCCUAGUA	SEQ ID N.º 239	UCACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGG
SEQ ID N.º 203	UUGGAGAUGGCAGUUUCCUAGUAA	SEQ ID N.º 240	CACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGA
SEQ ID N.º 204	UGGAGAUGGCAGUUUCCUAGUAAC	SEQ ID N.º 241	ACCAGAGUAACAGUCUGAGUAGGAG

Tabla 5: oligonucleótidos para el salto del exón 52 del gen de DMD

SEQ ID N.º 242	AGCCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUU	SEQ ID N.º 277	UUGGGCAGCGGUA AUGAGUUCUCC
SEQ ID N.º 243	GCCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUU	SEQ ID N.º 278	UGGGCAGCGGUA AUGAGUUCUCCA
SEQ ID N.º 244	CCUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUU	SEQ ID N.º 279	GGGCAGCGGUA AUGAGUUCUCCAA
SEQ ID N.º 245	CCUCUUGAUUGCUGGUCUUG	SEQ ID N.º 280	GGCAGCGGUA AUGAGUUCUCCAAC
SEQ ID N.º 246 PS232	CUCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUC	SEQ ID N.º 281	GCAGCGGUA AUGAGUUCUCCAACU
SEQ ID N.º 247	UCUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCA	SEQ ID N.º 282	CAGCGGUA AUGAGUUCUCCAACUG
SEQ ID N.º 248	CUUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCA	SEQ ID N.º 283	AGCGGUA AUGAGUUCUCCAACUGG
SEQ ID N.º 249	UUGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAA	SEQ ID N.º 284	GCGGUA AUGAGUUCUCCAACUGGG
SEQ ID N.º 250	UGAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAU	SEQ ID N.º 285	CGGUA AUGAGUUCUCCAACUGGGG
SEQ ID N.º 251	GAUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAU	SEQ ID N.º 286	GGUA AUGAGUUCUCCAACUGGGGA
SEQ ID N.º 252	GAUUGCUGGUCUUGUUUUUC	SEQ ID N.º 287	GGUA AUGAGUUCUCCAACUGG
SEQ ID N.º 253	AUUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUU	SEQ ID N.º 288	GUA AUGAGUUCUCCAACUGGGGAC
SEQ ID N.º 254	UUGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUU	SEQ ID N.º 289	UA AUGAGUUCUCCAACUGGGGACG
SEQ ID N.º 255	UGCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUG	SEQ ID N.º 290	AAUGAGUUCUCCAACUGGGGACGC
SEQ ID N.º 256	GCUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGG	SEQ ID N.º 291	AUGAGUUCUCCAACUGGGGACGCC
SEQ ID N.º 257	CUGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGG	SEQ ID N.º 292	UGAGUUCUCCAACUGGGGACGCCU

SEQ ID N.º 258	UGGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGC	SEQ ID N.º 293	GAGUUCUCCAACUGGGGACGCCUC
SEQ ID N.º 259	GGUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCA	SEQ ID N.º 294	AGUUCUCCAACUGGGGACGCCUCU
SEQ ID N.º 260	GUCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAG	SEQ ID N.º 295	GUUCUCCAACUGGGGACGCCUCUG
SEQ ID N.º 261	UCUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAGC	SEQ ID N.º 296	UUCUCCAACUGGGGACGCCUCUGU
SEQ ID N.º 262	CUUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAGCG	SEQ ID N.º 297	UCUCCAACUGGGGACGCCUCUGUU
SEQ ID N.º 263	UUGUUUUUCAAAUUUUGGGCAGCGG	SEQ ID N.º 298	CUCCAACUGGGGACGCCUCUGUUC
SEQ ID N.º 264	UGUUUUUCAAAUUUUGGGCAGCGGU	SEQ ID N.º 299 PS236	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUCC
SEQ ID N.º 265	GUUUUUUCAAAUUUUGGGCAGCGGUA	SEQ ID N.º 300	UCCAACUGGGGACGCCUCUGUCCA
SEQ ID N.º 266	UUUUUCAAAUUUUGGGCAGCGGUAA	SEQ ID N.º 301	CCAACUGGGGACGCCUCUGUCCAA
SEQ ID N.º 267	UUUUCAAUUUUGGGCAGCGGUAAU	SEQ ID N.º 302	CAACUGGGGACGCCUCUGUCCAAA
SEQ ID N.º 268	UUUCAAAUUUUGGGCAGCGGUAAUG	SEQ ID N.º 303	AACUGGGGACGCCUCUGUCCAAU
SEQ ID N.º 269	UUCAAAUUUUGGGCAGCGGUAAUGA	SEQ ID N.º 304	ACUGGGGACGCCUCUGUCCAAAUC
SEQ ID N.º 270	UCAAAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAG	SEQ ID N.º 305	CUGGGGACGCCUCUGUCCAAAUCC
SEQ ID N.º 271	CAAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGU	SEQ ID N.º 306	UGGGGACGCCUCUGUCCAAAUCCU
SEQ ID N.º 272	AAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUU	SEQ ID N.º 307	GGGACGCCUCUGUCCAAAUCCUG
SEQ ID N.º 273	AAUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUC	SEQ ID N.º 308	GGGACGCCUCUGUCCAAAUCCUGC
SEQ ID N.º 274	AUUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUCU	SEQ ID N.º 309	GGACGCCUCUGUCCAAAUCCUGCA
SEQ ID N.º 275	UUUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUCUU	SEQ ID N.º 310	GACGCCUCUGUCCAAAUCCUGCAU
SEQ ID N.º 276	UUUGGGCAGCGGUAAUGAGUUCUUC		

Tabla 6: oligonucleótidos para el salto del exón 53 del gen de DMD

SEQ ID N.º 311	CUCUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUC	SEQ ID N.º 335	CAGCUUCUCCUAGCUUCCAGCCA
SEQ ID N.º 312	UCUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCA	SEQ ID N.º 336	AGCUUCUCCUAGCUUCCAGCCAU
SEQ ID N.º 313	CUGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCAG	SEQ ID N.º 337	GCUUCUCCUAGCUUCCAGCCAUI
SEQ ID N.º 314	UGGCCUGUCCUAAGACCUGCUCAGC	SEQ ID N.º 338	CUUCUCCUAGCUUCCAGCCAUIUG
SEQ ID N.º 315	GGCCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCU	SEQ ID N.º 339	UUCUCCUAGCUUCCAGCCAUIUGU

SEQ ID N.º 316	GCCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUU	SEQ ID N.º 340	UCUCCUAGCUUCCAGCCAUUGUG
SEQ ID N.º 317	CCUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUC	SEQ ID N.º 341	CUUCCUAGCUUCCAGCCAUUGUGU
SEQ ID N.º 318	CUGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUCU	SEQ ID N.º 342	UUCUAGCUUCCAGCCAUUGUGUU
SEQ ID N.º 319	UGUCCUAAGACCUGCUCAGCUUCUU	SEQ ID N.º 343	UCCUAGCUUCCAGCCAUUGUGUUG
SEQ ID N.º 320	GUCCUAAGACCUGCUCAGCUUCUUC	SEQ ID N.º 344	CCUAGCUUCCAGCCAUUGUGUUGA
SEQ ID N.º 321	UCCUAAGACCUGCUCAGCUUCUUC	SEQ ID N.º 345	CUUAGCUUCCAGCCAUUGUGUUGAA
SEQ ID N.º 322	CCUAAGACCUGCUCAGCUUCUUCU	SEQ ID N.º 346	UUAGCUUCCAGCCAUUGUGUUGAAU
SEQ ID N.º 323	CUAAGACCUGCUCAGCUUCUUCUU	SEQ ID N.º 347	UAGCUUCCAGCCAUUGUGUUGAAUC
SEQ ID N.º 324	UAAGACCUGCUCAGCUUCUUCUUA	SEQ ID N.º 348	AGCUUCCAGCCAUUGUGUUGAAUCC
SEQ ID N.º 325	AAGACCUGCUCAGCUUCUUCUUCUAG	SEQ ID N.º 349	GCUUCCAGCCAUUGUGUUGAAUCCU
SEQ ID N.º 326	AGACCUGCUCAGCUUCUUCUUCUAGC	SEQ ID N.º 350	CUUCCAGCCAUUGUGUUGAAUCCUU
SEQ ID N.º 327	GACCUGCUCAGCUUCUUCUUCUAGCU	SEQ ID N.º 351	UUCAGCCAUUGUGUUGAAUCCUUU
SEQ ID N.º 328	ACCUGCUCAGCUUCUUCUUCUAGCUU	SEQ ID N.º 352	UCCAGCCAUUGUGUUGAAUCCUUUA
SEQ ID N.º 329	CCUGCUCAGCUUCUUCUUCUAGCUUC	SEQ ID N.º 353	CCAGCCAUUGUGUUGAAUCCUUUAA
SEQ ID N.º 330	CUGCUCAGCUUCUUCUUCUAGCUUCC	SEQ ID N.º 354	CAGCCAUUGUGUUGAAUCCUUUAAC
SEQ ID N.º 331	UGCUCAGCUUCUUCUUCUAGCUUCCA	SEQ ID N.º 355	AGCCAUUGUGUUGAAUCCUUUAACA
SEQ ID N.º 332	GCUCAGCUUCUUCUUCUAGCUUCCAG	SEQ ID N.º 356	GCCAUUGUGUUGAAUCCUUUAACAU
SEQ ID N.º 333	CUCAGCUUCUUCUUCUAGCUUCCAGC	SEQ ID N.º 357	CCAUUGUGUUGAAUCCUUUAACAUU
SEQ ID N.º 334	UCAGCUUCUUCUUCUAGCUUCCAGCC	SEQ ID N.º 358	CAUUGUGUUGAAUCCUUUAACAUUU

Tabla 7: oligonucleótidos para el salto de otros exones del gen de DMD como se identifica

Exón 6 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 359	CAUUUUUGACCUACAUGUGG	SEQ ID N.º 364	AUUUUUGACCUACAUGGGAAA G
SEQ ID N.º 360	UUUGACCUACAUGUGGAAAG	SEQ ID N.º 365	UACGAGUUGAUUGUCGGACCCAG
SEQ ID N.º 361	UACAUUUUUUGACCUACAUGUGGAA AG	SEQ ID N.º 366	GUGGUCUCCUACCUAUGACUGUGG
SEQ ID N.º 362	GGUCUCCUACCUAUGA	SEQ ID N.º 367	UGUCUCAGUAAUCUUCUACCUAU
SEQ ID	UCUUACCUAUGACUAUGGAUGAGA		

N.º 363			
Exón 7 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 368	UGCAUGUCCAGUCGUUGUGUGG	SEQ ID N.º 370	AUUUACCAACCUUCAGGAUCGAGU A
SEQ ID N.º 369	CACUAUCCAGUCAAAUAGGUCUGG	SEQ ID N.º 371	GGCCUAAAACACAUACACAU
Exón 11 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 372	CCCUGAGGCAUUCCEAUCUUGAAU	SEQ ID N.º 374	CUUGAAUUUAGGAGAUUCAUCU G
SEQ ID N.º 373	AGGACUUACUUGCUUUGUUU	SEQ ID N.º 375	CAUCUUCUGAUAAUUUUCUGUU
Exón 17 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 376	CCAUUACAGUUGUCUGUGUU	SEQ ID N.º 378	UAAUCUGCCUCUUCUUUUGG
SEQ ID N.º 377	UGACAGCCUGUGAAAUCUGUGAG		
Exón 19 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 379	CAGCAGUAGUUGUCAUCUGC	SEQ ID N.º 381	GCCUGAGCUGAUCUGCUGGCAUC UUGCAGUU
SEQ ID N.º 380	GCCUGAGCUGAUCUGCUGGCAUCUUG C	SEQ ID N.º 382	UCUGCUGGCAUCUUGC
Exón 21 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 383	GCCGGUUGACUUCAUCCUGUGC	SEQ ID N.º 386	CUGCAUCCAGGAACAUGGGUCC
SEQ ID N.º 384	GUCUGCAUCCAGGAACAUGGGUC	SEQ ID N.º 387	GUUGAAGAUCUGAUAGCCGGUU GA
SEQ ID N.º 385	UACUUACUGUCUGUAGCUCUUUCU		
Exón 44 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 388	UCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEQ ID N.º 413	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA A
SEQ ID N.º 389	UUCAGCUUCUGUUAGCCACU	SEQ ID N.º 414	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA AA

ES 2 692 886 T3

SEQ ID N.º 390	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEQ ID N.º 415	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA A
SEQ ID N.º 391	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N.º 416	AGCUUCUGUUAGCCACUGAU
SEQ ID N.º 392	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N.º 417	GCUUCUGUUAGCCACUGAUU
SEQ ID N.º 393	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N.º 418	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU
SEQ ID N.º 394	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGA	SEQ ID N.º 419	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUA
SEQ ID N.º 395	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEQ ID N.º 420	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA
SEQ ID N.º 396	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEQ ID N.º 421	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA
SEQ ID N.º 397	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N.º 422	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA
SEQ ID N.º 398	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N.º 423	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEQ ID N.º 399	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N.º 424	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA
			A
SEQ ID N.º 400	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUA	SEQ ID N.º 425	GCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA
SEQ ID N.º 401	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N.º 426	CCAUUUGUAUUUAGCAUGUCC
SEQ ID N.º 402	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N.º 427	AGAUACCAUUUGUAUUUAGC
SEQ ID N.º 403	UCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N.º 428	GCCAUUUCUCAACAGAUCU
SEQ ID N.º 404	UUCAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAAA	SEQ ID N.º 429	GCCAUUUCUCAACAGAUCUGUCA
SEQ ID N.º 405	CAGCUUCUGUUAGCCACUG	SEQ ID N.º 430	AUUCUCAGGAUUUGUGUCUUUC
SEQ ID N.º 406	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAU	SEQ ID N.º 431	UCUCAGGAUUUGUGUCUUUC
SEQ ID N.º 407	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N.º 432	GUUCAGCUUCUGUUAGCC
SEQ ID N.º 408	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUU	SEQ ID N.º 433	CUGAUUAAAUAUCUUUAU C
SEQ ID N.º 409	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N.º 434	GCCGCCAUUUCUCAACAG
SEQ ID N.º 410	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUA	SEQ ID N.º 435	GUAUUUAGCAUGUCCCA
SEQ ID N.º 411	AGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA	SEQ ID N.º 436	CAGGAUUUGUGUCUUUC
SEQ ID N.º 412	CAGCUUCUGUUAGCCACUGAUUAA		

ES 2 692 886 T3

Exón 45 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 437	UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUCCUG	SEQ ID N.º 470	GUUGCAUUCAAUGUUCUGACAACAG
SEQ ID N.º 438	AUUCAAUGUUCUGACAACAGUUUGC	SEQ ID N.º 471	UUGCAUUCAAUGUUCUGACAACA
SEQ ID N.º 439	CCAGUUGCAUUCAAUGUUCUGACAA	SEQ ID N.º 472	UGCAUUCAAUGUUCUGACAACAGUU
SEQ ID N.º 440	CAGUUGCAUUCAAUGUUCUGAC	SEQ ID N.º 473	GCAUUCAAUGUUCUGACAACAGUU
SEQ ID N.º 441	AGUUGCAUUCAAUGUUCUGA	SEQ ID N.º 474	CAUUCAAUGUUCUGACAACAGUUUG
SEQ ID N.º 442	GAUUGCUGAAUUUUUCUCC	SEQ ID N.º 475	AUUCAAUGUUCUGACAACAGUUUGC
SEQ ID N.º 443	GAUUGCUGAAUUUUUCUCCCCAG	SEQ ID N.º 476	UCAUGUUCUGACAACAGUUUGC
SEQ ID N.º 444	AUUGCUGAAUUUUUCUCCCCAGU	SEQ ID N.º 477	CAAUGUUCUGACAACAGUUUGCCGC
SEQ ID N.º 445	UUGCUGAAUUUUUCUCCCCAGUU	SEQ ID N.º 478	AAUGUUCUGACAACAGUUUGCCGCU
SEQ ID N.º 446	UGCUGAAUUUUUCUCCCCAGUUG	SEQ ID N.º 479	AUGUUCUGACAACAGUUUGCCGCGC
SEQ ID N.º 447	GCUGAAUUUUUCUCCCCAGUUGC	SEQ ID N.º 480	UGUUCUGACAACAGUUUGCCGCGCU
SEQ ID N.º 448	CUGAAUUUUUCUCCCCAGUUGCA	SEQ ID N.º 481	GUUCUGACAACAGUUUGCCGCGCUGCC
SEQ ID N.º 449	UGAAUUUUUCUCCCCAGUUGCAU	SEQ ID N.º 482	UUCUGACAACAGUUUGCCGCGCUGCC
SEQ ID N.º 450	GAAUUUUUCUCCCCAGUUGCAUU	SEQ ID N.º 483	UCUGACAACAGUUUGCCGCGCUGCCCA
SEQ ID N.º 451	AAUUUUUCUCCCCAGUUGCAUUC	SEQ ID N.º 484	CUGACAACAGUUUGCCGCGCUGCCCCAA

ES 2 692 886 T3

SEQ ID N.º 452	AUUUUUCUCCCCAGUUGCAUUCA	SEQ ID N.º 485	UGACAACAGUUUGCCGCUGCCCA AU
SEQ ID N.º 453	UUUUUCUCCCCAGUUGCAUUCAA	SEQ ID N.º 486	GACAACAGUUUGCCGCUGCCCAA UG
SEQ ID N.º 454	UUUUCUCCCCAGUUGCAUUCAAU	SEQ ID N.º 487	ACAACAGUUUGCCGCUGCCCAAU GC
SEQ ID N.º 455	AUUUCUCCCCAGUUGCAUUCA AUG	SEQ ID N.º 488	CAACAGUUUGCCGCUGCCCAAUG CC
SEQ ID N.º 456	UUUCUCCCCAGUUGCAUUCA AUGU	SEQ ID N.º 489	AACAGUUUGCCGCUGCCCAAUGC CA
SEQ ID N.º 457	UUCUCCCCAGUUGCAUUCA AUGUU	SEQ ID N.º 490	ACAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCC AU
SEQ ID N.º 458	UCUCCCCAGUUGCAUUCA AUGUUC	SEQ ID N.º 491	CAGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCA UC
SEQ ID N.º 459	CUCCCCAGUUGCAUUCA AUGUUCU	SEQ ID N.º 492	AGUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAU CC
SEQ ID N.º 460	UCCCCAGUUGCAUUCA AUGUUCUG	SEQ ID N.º 493	GUUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUC CU
SEQ ID N.º 461	UCCCCAGUUGCAUUCA AUGUUCUGA	SEQ ID N.º 494	UUUGCCGCUGCCCAAUGCCAUC UG
SEQ ID N.º 462	CCCCAGUUGCAUUCA AUGUUCUGAC	SEQ ID N.º 495	UUGCCGCUGCCCAAUGCCAUC GG
SEQ ID N.º 463	CCCAGUUGCAUUCA AUGUUCUGACA	SEQ ID N.º 496	UGCCGCUGCCCAAUGCCAUC GA
SEQ ID N.º 464	CCAGUUGCAUUCA AUGUUCUGACAA	SEQ ID N.º 497	GCCGCUGCCCAAUGCCAUC AG
SEQ ID N.º 465	CAGUUGCAUUCA AUGUUCUGACAAC	SEQ ID N.º 498	CCGCUGCCCAAUGCCAUC GU
SEQ ID N.º 466	AGUUGCAUUCA AUGUUCUGACAACA	SEQ ID N.º 499	CGCUGCCCAAUGCCAUC UU
SEQ ID	UCC UGU AGA AUA CUG GCA UC	SEQ ID	UGUUUUUGAGGAUUGCUGAA

ES 2 692 886 T3

N.º 467		N.º 500	
SEQ ID N.º 468	UGCAGACCUCCUGCCACCGCAGAUUC A	SEQ ID N.º 501	UGUUCUGACAACAGUUUGCCGCU GCCCAAUGCCAUCCUGG
SEQ ID N.º 469	UUGCAGACCUCCUGCCACCGCAGAUUC UUC	AGGC	
Exón 55 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 502	CUGUUGCAGUAAUCUAUGAG	SEQ ID	UGCCAUUGUUUCAUCAGCUCUUU
		N.º 505	
SEQ ID N.º 503	UGCAGUAAUCUAUGAGUUUC	SEQ ID N.º 506	UCCUGUAGGACAUUGGCAGU
SEQ ID N.º 504	GAGUCUUCUAGGAGCCUU	SEQ ID N.º 507	CUUGGAGUCUUCUAGGAGCC
Exón 57 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 508	UAGGUGCCUGCCGGCUU	SEQ ID N.º 510	CUGAACUGCUGGAAAGUCGCC
SEQ ID N.º 509	UUCAGCUGUAGCCACACC	SEQ ID N.º 511	CUGGCUUCCAAAUGGGACCUGAA AAAGAAC
Exón 59 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 512	CAUUUUUCCACUCAGUAUU	SEQ ID N.º 514	UCCUCAGGAGGCAGCUCUAAAU
SEQ ID N.º 513	UUGAAGUCCUGGAGUCUU		
Exón 62 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 515	UGGCUCUCUCCAGGG	SEQ ID N.º 517	GGGCACUUUGUUUGGCG
SEQ ID N.º 516	GAGAUGGCUCUCUCCAGGGACCCUG G		
Exón 63 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 518	GGUCCCAGCAAGUUGUUUG	SEQ ID N.º 520	GUAGAGCUCUGUCAUUUUGGG
SEQ ID N.º 519	UGGGAUGGUCCCAGCAAGUUGUUUG		
Exón 65 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 521	GCUCAAGAGAUCACUGCAAAAAAC	SEQ ID N.º 523	UCUGCAGGAUAUCCAUGGGCUGG UC

SEQ ID N.º 522	GCCAUACGUACGUAUCAUAAACAUC		
Exón 66 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 524	GAUCCUCCUGUUCGUCCCUAUUAU G		
Exón 69 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 525	UGCUUUAGACUCCUGUACCUGAUA		
Exón 75 del gen de DMD			
SEQ ID N.º 526	GGCGGCCUUUGUGUUGAC	SEQ ID N.º 528	CCUUUAUGUUCGUGCUGCU
SEQ ID N.º 527	GGACAGGCCUUUAUGUUCGUGCUGC		

Legendas de las figuras

[0091]

5

Figura 1. En miotubos de control humano, una serie de AON (PS237, PS238, y PS240; SEQ ID N.º 65, 66, 16 respectivamente) dirigidos al exón 43 se evaluó a 500 nM. PS237 (SEQ ID N.º 65) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 43. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas)

10

Figura 2. En miotubos de un paciente con DMD con una delección del exón 45, una serie de AON (PS177, PS179, PS181, y PS182; SEQ ID N.º 91, 70, 110, y 117 respectivamente) dirigidos al exón 46 se evaluó en dos concentraciones diferentes (50 y 150 nM). PS182 (SEQ ID N.º 117) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 46. (M: marcador de tamaño de ADN)

15

Figura 3. En miotubos de control humano, una serie de AON (PS245, PS246, PS247, y PS248, SEQ ID N.º 167, 165, 166, y 127 respectivamente) dirigidos al exón 50 se evaluó a 500 nM. PS248 (SEQ ID N.º 127) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 50. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas).

20

Figura 4. En miotubos de control humano, dos nuevos AON (PS232 y PS236; SEQ ID N.º 246 y 299 respectivamente) dirigidos al exón 52 se evaluaron en dos concentraciones diferentes (200 y 500 nM) y se compararon directamente con un AON (52-1) previamente descrito. PS236 (SEQ ID N.º 299) indujo reproductivamente los niveles más altos de salto del exón 52. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas).

25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Oligonucleótido antisentido, donde dicho oligonucleótido antisentido comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos antisentido SEQ ID N.º: 287.
2. Oligonucleótido según la reivindicación 1, que comprende un oligonucleótido antisentido 2'-O-
alquilfosforotioato.
- 10 3. Oligonucleótido según la reivindicación 2, que comprende una ribosa 2'-O-metilfosforotioato.
4. Oligonucleótido según la reivindicación 1, donde el oligonucleótido es un oligómero de morfolino
fosfordiamidato (PMO).
- 15 5. Vector basado en virus, que comprende un casete de expresión que impulsa la expresión de un oligonucleótido tal y como se define en la reivindicación 1.
6. Oligonucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el vector basado en virus según la
reivindicación 5 para el uso como un medicamento, preferiblemente para modular el empalme del pre-ARNm de
20 la distrofina de un paciente con DMD o BMD o para el tratamiento de un paciente con DMD o BMD.
7. Composición farmacéutica que comprende un oligonucleótido tal y como se define en cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 4 y/o el vector según la reivindicación 5, un portador farmacéutico aceptable, y
opcionalmente combinado con un oligonucleótido antisentido que es capaz de inducir o promover el salto de al
25 menos uno de los exones 51, 53, 55, 57, 59 o 69 del preARNm de la distrofina de un paciente.
8. Método *in vitro* o *ex vivo* para inducir y/o promover el salto de al menos el exón 52 del pre-ARNm de la
distrofina en una célula aislada de un paciente, donde el método comprende proporcionar a dicha célula un
oligonucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o el vector según la reivindicación
30 5.
9. Método según la reivindicación 8, donde se usa un oligonucleótido antisentido adicional que es capaz de
inducir o promover el salto de al menos uno de los exones 51, 53, 55, 57, 59 o 69 del pre-ARNm de la distrofina
de un paciente.
35
10. Uso del oligonucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, del vector según la
reivindicación 5, o de la composición farmacéutica según la reivindicación 7 para modular el empalme del pre-
ARNm de la distrofina en una célula miogénica humana o célula muscular *in vitro*, o para la preparación de un
40 medicamento para el tratamiento de un paciente con DMD o BMD.

Fig 1

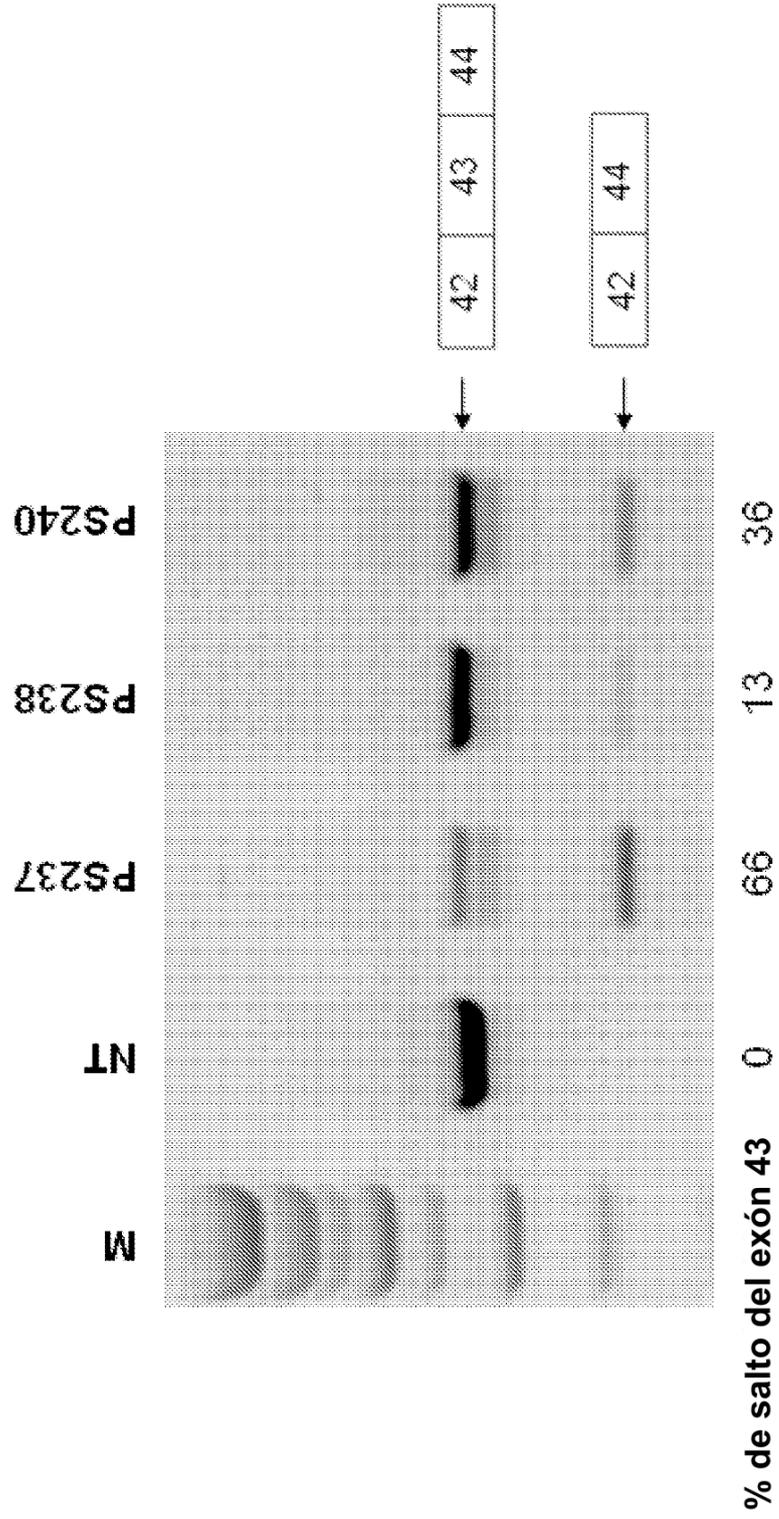


Fig 2

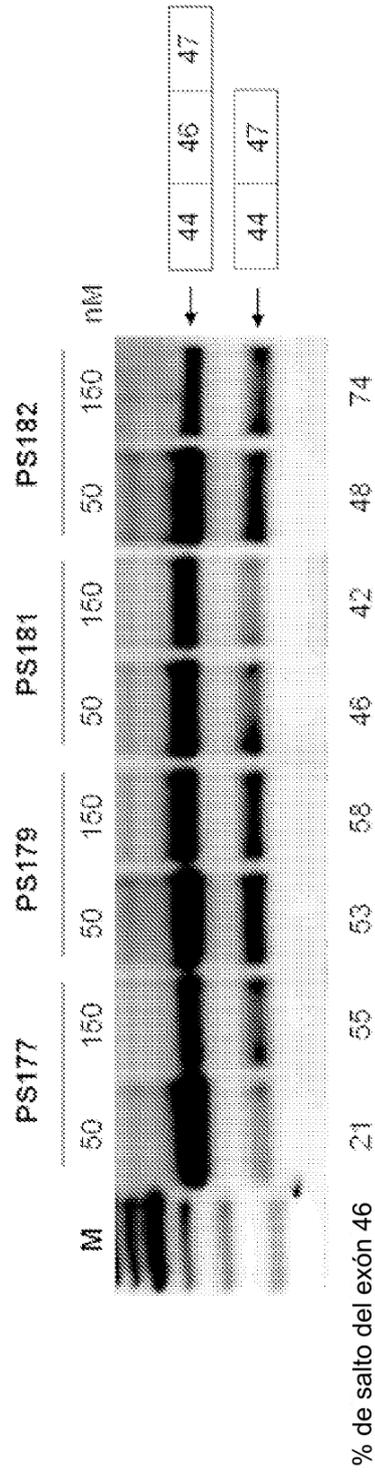


Fig 3

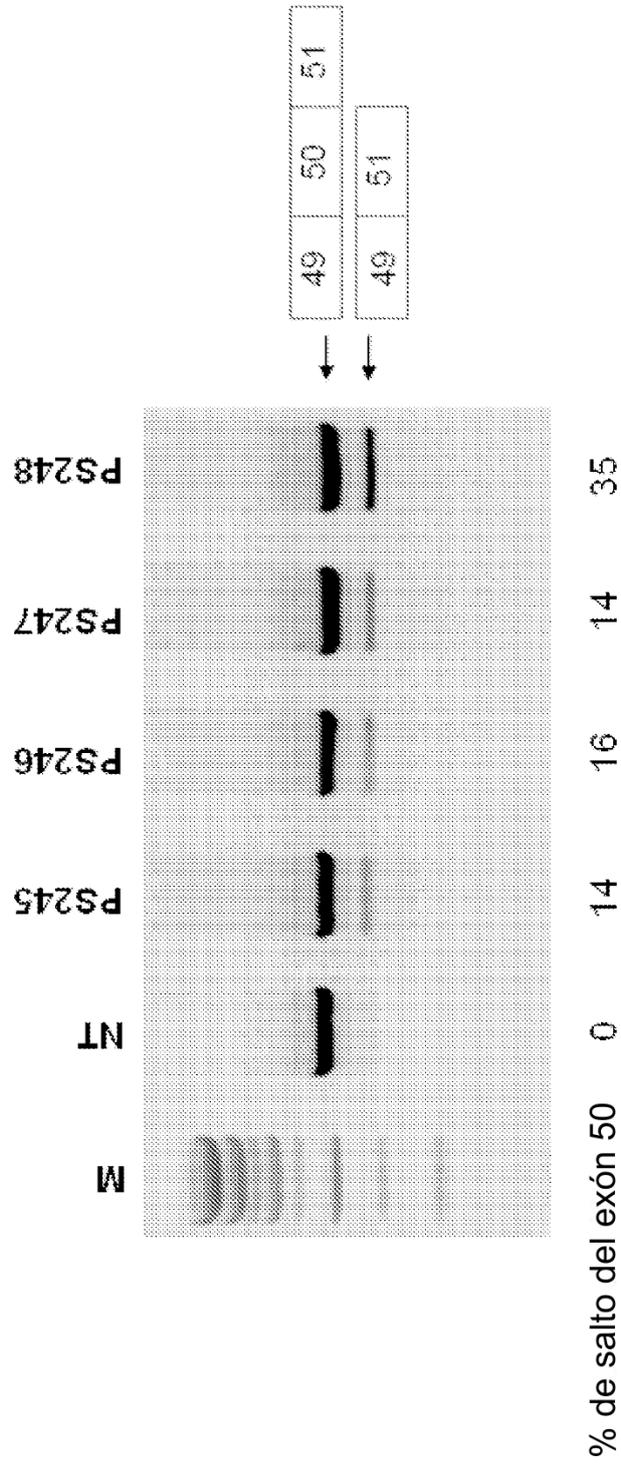


Fig 4

