

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 459**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

**A61P 21/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.11.2010 PCT/AU2010/001520**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011 WO11057350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.11.2010 E 10829367 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2499249**

54 Título: **Moléculas antisentido y métodos para el tratamiento de patologías**

30 Prioridad:

**12.11.2009 AU 2009905549**

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

**11.12.2018**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA  
(100.0%)**

**Stirling Highway  
Nedlands, Western Australia 6907 , AU**

72 Inventor/es:

**WILTON, STEPHEN;  
FLETCHER, SUE;  
ADAMS, ABBIE y  
MELONI, PENNY**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 693 459 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Moléculas antisentido y métodos para el tratamiento de patologías

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a nuevos compuestos y composiciones antisentido adecuados para facilitar la omisión exónica. Proporciona además composiciones terapéuticas adaptadas a la utilización en los métodos de la invención

## 10 Antecedentes de la técnica

El análisis a continuación de los antecedentes de la técnica pretende facilitar exclusivamente la comprensión de la presente invención. El análisis no es un reconocimiento o admisión de que alguna parte del material al que se hace referencia es o ha sido parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de la solicitud. Actualmente se está realizando un esfuerzo significativo en la investigación de métodos para suprimir o compensar mutaciones en genes causantes de enfermedades. Se están desarrollando tecnologías antisentido usando una serie de procesos químicos para afectar a la expresión génica en una variedad de niveles diferentes (transcripción, corte y empalme, estabilidad, traducción). Gran parte de esa investigación se ha centrado en el uso de compuestos antisentido para corregir o compensar genes anómalos o asociados con la enfermedad en infinidad de afecciones diferentes.

20 Las moléculas antisentido son capaces de inhibir la expresión génica con una especificidad exquisita y, por esta causa, numerosos esfuerzos concentrados en los oligonucleótidos como moduladores de la expresión génica se han centrado en inhibir la expresión de genes diana tales como oncogenes o genes víricos. Los oligonucleótidos antisentido se dirigen, bien contra ARN (cadena de sentido) o bien contra ADN, en el que forman estructuras tríplex que inhiben la transcripción por la ARN polimerasa II.

25 Para lograr un efecto deseado en la regulación génica negativa específica, los oligonucleótidos tienen, bien que estimular la degradación del ARNm diana, o bien bloquear la traducción de ese ARNm, evitando de esta manera de forma eficaz la síntesis *de novo* de la proteína diana no deseable.

30 Dichas técnicas no resultan útiles en los casos en que el objetivo es regular positivamente la producción de la proteína nativa o compensar mutaciones que inducen la terminación prematura de la traducción, tales como mutaciones sin sentido o de desplazamiento del marco de lectura.

35 Además, en los casos en que una proteína normalmente funcional se termina prematuramente por mutaciones en la misma, se ha demostrado que es posible un medio para la restauración de cierta producción de proteína funcional mediante tecnología antisentido, a través de la intervención durante los procesos de corte y empalme (Sierakowska H, et al., (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93,12840, 12840-12844; Wilton SD, et al., (1999) Neuromusc Disorders 9.330, 330-338; van Deutekom JC et al., (2001) Human Mol Genet 10, 1547-1554). En estos casos, el transcrito defectuoso del gen no debería someterse a degradación dirigida para que el proceso químico del oligonucleótido antisentido no estimule la degradación del ARNm diana.

45 En una variedad de enfermedades genéticas, los efectos de las mutaciones sobre la expresión final de un gen pueden modularse a través de un procedimiento dirigido de omisión exónica durante el proceso de corte y empalme. El proceso de corte y empalme está dirigido por una compleja maquinaria multipartícula que reúne en estrecha proximidad las uniones exón-intrón contiguas en el pre-ARNm y realiza el corte de los enlaces fosfodiéster en los extremos de los intrones con su posterior reforma entre los exones que van a cortarse y empalmarse entre sí. Este proceso complejo y de elevada precisión está mediado por motivos de secuencia en el pre-ARNm que son segmentos de ARN relativamente cortos y semiconservados a los que se unen los diversos factores nucleares de corte y empalme que participan después en las reacciones de corte y empalme. Mediante la modificación de la forma en que la maquinaria de corte y empalme lee o reconoce los motivos que participan en el procesamiento del pre-ARNm, resulta posible crear moléculas de ARNm cortadas y empalmadas de forma diferencial. Actualmente se ha reconocido que la mayoría de los genes humanos se cortan y empalman de forma alternativa durante la expresión génica normal, aunque los mecanismos invocados no se han identificado. Mediante el uso de oligonucleótidos antisentido, se ha demostrado que los errores y las deficiencias en un ARNm codificado podrían evitarse o eliminarse de los transcritos génicos maduros.

55 Bajo condiciones naturales no se entiende bien cuál es el grado de participación de la delección genética u omisión exónica en el proceso de corte y empalme, aunque se ha documentado que sucede en muchos casos, generalmente a niveles muy bajos (Sherrat T.G. et al., Am. J. Hum. Genet. 53:1007-1015, 1993). Sin embargo, se reconoce que si los exones asociados con mutaciones causantes de enfermedad pueden deleccionarse de algunos genes de forma específica, puede producirse en ocasiones un producto proteína acortado que tiene propiedades biológicas similares a las de la proteína nativa o que tiene una actividad biológica suficiente para aliviar la enfermedad causada por las mutaciones asociadas al exón diana (Lu Q.L. et al., Nature Medicine 9:1009-1014, 2003; Aartsma-Rus A et al., Am. J. Hum. Genet. 74: 83-92, 2004).

65

Es probable que este proceso de omisión exónica dirigida resulte particularmente útil en genes largos en los que hay numerosos exones e intrones, en donde hay redundancia en la constitución genética de los exones o en los que una proteína es capaz de funcionar sin uno o más exones particulares (p. ej., con el gen de la distrofina, que consta de 79 exones, o posiblemente, algunos genes de colágeno que codifican bloques de secuencia repetidos o los enormes genes de nebulina o titina, que están constituidos de ~80 y más de 370 exones, respectivamente).

Los esfuerzos por redirigir el procesamiento génico al tratamiento de enfermedades genéticas asociadas a truncados causados por mutaciones en diversos genes se han centrado en la utilización de oligonucleótidos antisentido que: (1) se solapan total o parcialmente con los elementos que participan en el proceso de corte y empalme, o (2) se unen al pre-ARNm en una posición suficientemente próxima al elemento para interferir en la unión y función de los factores de corte y empalme que normalmente mediarían en una reacción particular de corte y empalme que se produce en ese elemento (p.ej., se une al pre-ARNm en una posición a 3, 6 o 9 nucleótidos del elemento que debe bloquearse).

Por ejemplo, la modulación del corte y empalme del pre-ARNm de la distrofina mutante con oligorribonucleótidos antisentido se ha informado tanto *in vitro* como *in vivo*. En un tipo de mutación de distrofina publicado en Japón, una mutación por delección de 52 pares de bases provoca que durante el proceso de corte y empalme se elimine el exón 19 con los intrones flanqueantes (Matsuo et al., (1991) J Clin Invest. 87:2127-2131). Se ha usado un sistema *in vitro* de corte y empalme minigénico para demostrar que un 31-mero 2'-O-metil oligorribonucleótido complementario a la mitad 5' de la secuencia delecionada del exón 19 de distrofina de Kobe inhibía el corte y empalme del pre-ARNm de tipo salvaje (Takeshima et al., J. Clin. Invest. 95:515-520, 1995). El mismo oligonucleótido se usó para inducir la omisión exónica a partir del transcrito nativo del gen de distrofina en células linfoblastoides humanas en cultivo.

Dunckley et al., Nucleosides & Nucleotides, 16:1665-1668, 1997, han descrito constructos *in vitro* para el análisis de corte y empalme alrededor del exón 23 de distrofina mutada en el ratón mutante mdx, un modelo de distrofia muscular. Se proporciona un comentario de los planes para analizar estos constructos *in vitro* usando oligonucleótidos modificados en 2' dirigidos a los sitios de corte y empalme dentro y contiguos al exón 23 de distrofina de ratón, aunque no se proporciona ningún sitio ni secuencia diana.

Posteriormente, se informó de 2'-O-metil oligorribonucleótidos que corregían la deficiencia de distrofina en mioblastos del ratón mdx de este grupo. Se ha informado de que un oligonucleótido antisentido dirigido al sitio de corte y empalme 3' del intrón 22 de la distrofina murina causa la omisión del exón mutante así como de varios exones flanqueantes y crea un nuevo transcrito de distrofina dentro del marco de lectura con una nueva delección interna. Esta distrofina mutada se expresó en 1-2 % de los miotubos de mdx tratados con moléculas antisentido. Se describe el uso de otras modificaciones de oligonucleótidos tales como 2'-O-metoxietil-fosfodiésteres (Dunckley et al. (1998) Human Mol. Genetics, 5, 1083-90).

De esta manera, las moléculas antisentido pueden proporcionar una herramienta para el tratamiento de trastornos genéticos tales como la distrofia muscular de Duchenne (DMD). Sin embargo, los intentos para inducir omisión exónica usando moléculas antisentido han tenido un éxito desigual.

Los estudios sobre el exón 19 de la distrofina han sido la omisión con éxito de este exón del pre-ARNm de la distrofina utilizando una diversidad de moléculas antisentido dirigidas a los sitios o motivos de corte y empalme flanqueantes dentro del exón que participan en la definición de exón tal como indican Errington et al., J. Gen. Med. 5: 518-527, 2003).

En contraposición con la aparente facilidad de omisión del exón 19, actualmente se considera que la primera publicación de la omisión del exón 23 en el ratón mdx, por Dunckley et al., (1998) informa únicamente de un transcrito revertiente que aparece de forma natural, o de un artefacto más que de cualquier actividad antisentido verdadera. Además de no generar de forma sistemática transcritos sin el exón 23, Durickley et al., (1998) no demostraron en ningún momento ningún curso temporal de omisión exónica inducida o incluso de titulación de oligonucleótidos antisentido, para demostrar efectos dependientes de dosis en los que los niveles de omisión exónica se correspondieran con cantidades crecientes o decrecientes de oligonucleótido antisentido. Además, este trabajo no pudo ser reproducido por otros investigadores.

El primer ejemplo de omisión exónica específica y reproducible en el modelo de ratón mdx fue publicado por Witton et al. (1999) Neuromuscular Disorders 9.330, 338-338. Dirigiendo una molécula antisentido al sitio de corte y empalme donante, se indujo una omisión eficaz y sistemática del exón 23 en el ARNm de la distrofina a las 6 horas de tratamiento de las células cultivadas. Wilton et al., (1999), también describen el reconocimiento de la región aceptora del pre-ARNm de la distrofina de ratón por oligonucleótidos antisentido más largos y su incapacidad de repetir los resultados publicados por Dunckley et al. (1998). No pudo detectarse de manera reproducible ninguna omisión exónica, ni del 23 solo, ni de la delección múltiple de varios exones flanqueantes utilizando una selección de oligonucleótidos antisentido dirigidos hacia el sitio de corte y empalme aceptor del intrón 22.

Aunque el primer oligonucleótido antisentido dirigido al sitio de corte y empalme donante del intrón 23 inducía la omisión sistemática de exones en mioblastos en cultivo primario, se encontró que este compuesto era mucho menos eficiente en cultivos de células inmortalizadas que expresaban niveles más elevados de distrofina. Sin embargo, con un reconocimiento más afinado y el diseño de oligonucleótidos antisentido, la eficiencia de la delección de exones específicos se incrementó prácticamente en un orden de magnitud (véase Mann C.J. et al., J. Gen. Med. 4:644-654, 2002).

El documento nº WO2010/048583 proporciona moléculas antisentido capaces de unirse a un sitio diana seleccionado en un gen de distrofina humana para inhibir la omisión exónica.

Sigue existiendo una necesidad de proporcionar oligonucleótidos antisentido capaces de unirse y de modificar el corte y empalme de una secuencia diana de nucleótidos. La simple dirección de los oligonucleótidos antisentido a motivos que se supone que son cruciales para el corte y empalme no es una garantía de la eficacia de dicho compuesto en un contexto terapéutico.

El análisis anterior de los antecedentes de la invención pretende únicamente facilitar la comprensión de la misma. Debería apreciarse que el análisis no es un reconocimiento o admisión de que cualquier parte del material al que se hace referencia es o ha sido parte del conocimiento general común en la fecha de prioridad de la solicitud.

#### Descripción resumida de la invención

La presente invención proporciona compuestos y composiciones de molécula antisentido adecuados para unirse a motivos de ARN que participan en el corte y empalme del pre-ARNm que son capaces de inducir una omisión exónica específica y eficiente y un método para la utilización de los mismos.

La elección de la selección diana desempeña un papel crucial en la eficacia de la omisión exónica y, por lo tanto, en su posterior aplicación en una terapia potencial. El simple diseño de moléculas antisentido con diana en regiones diana de pre-ARNm que se supone que participan en el corte y empalme no es una garantía de inducción de omisión exónica eficiente y específica. Las dianas más obvias o más fácilmente definidas para la intervención en el corte y empalme son los sitios donantes y aceptores de corte y empalme, aunque hay motivos menos definidos o conservados que incluyen intensificadores exónicos de corte y empalme, elementos silenciadores y puntos de ramificación. Los sitios donantes y aceptores de corte y empalme tienen secuencias de consenso de aproximadamente 16 y 8 bases respectivamente (véase la figura 1 para la representación esquemática de los motivos y dominios que participan en el reconocimiento exónico, la delección de intrones y el proceso de corte y empalme).

Según un primer aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido antisentido que induce la omisión del exón 45 en un pre-ARNm de distrofina humana, en el que el oligonucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en:

- i) un oligonucleótido antisentido de 22 bases que comprenden CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- ii) un oligonucleótido antisentido de 22 bases que comprende CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- iii) un oligonucleótido antisentido de 25 bases que comprende GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- iv) un oligonucleótido antisentido de 25 bases que comprende GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- v) un oligonucleótido antisentido de 28 bases que comprende GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- vi) un oligonucleótido antisentido de 28 bases que comprende GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- vii) un oligonucleótido antisentido de 31 bases que comprende GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
- viii) un oligonucleótido antisentido de 31 bases que comprende GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Para inducir la omisión exónica en los exones 5, 12, 17, 21, 22, 24, 43-47, 49, 50, 54-64, 66, 67, 70 y 72 en el transcrito del gen de distrofina, pueden seleccionarse moléculas antisentido del grupo indicado en la Tabla 1A.

Resulta posible combinar dos o más oligonucleótidos antisentido para inducir una omisión exónica más eficiente en los exones 3, 4, 8, 10, 26, 36, 48, 60, 66 y 68. Se dirige una combinación o "cóctel" de oligonucleótidos antisentido a los exones para inducir una omisión exónica eficiente.

Según un segundo aspecto, la presente invención proporciona una composición, que comprende un oligonucleótido antisentido según la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.

- 5 Según un tercer aspecto, la invención proporciona un oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según la presente invención o composición según la presente invención, para la utilización en un método de tratamiento de la distrofia muscular.

10 La invención se refiere además a la utilización de un oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo de la invención, o una composición de la presente invención, para la preparación de un medicamento destinado a la modulación de la distrofia muscular.

La distrofia muscular puede ser la distrofia muscular de Duchenne.

- 15 La invención proporciona además un método de tratamiento de una condición caracterizada por distrofia muscular de Duchenne, donde el método comprende administrar en el paciente que necesita tratamiento una cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido de la invención, relevante para la lesión genética particular en dicho paciente. Además, la invención proporciona un método para tratar de forma profiláctica a un paciente para prevenir o, por lo menos, minimizar la distrofia muscular de Duchenne, que comprende la etapa de: administración en el paciente de una  
20 cantidad eficaz de un oligonucleótido antisentido o de una composición farmacéutica que comprende una o más de estas moléculas biológicas.

Otros aspectos y ventajas de la invención resultarán evidentes para el experto en la materia a partir de una revisión de la descripción, posteriormente, en la que se hace referencia a las figuras a continuación.

- 25 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de motivos y dominios que participan en el reconocimiento de exones, la delección de intrones y el proceso de corte y empalme.

- 30 Figura 2. Representación diagramática del concepto de omisión exónica inducida por oligonucleótido antisentido para evitar las mutaciones causantes de enfermedad (no representado a escala). La caja sombreada representa un exón portador de una mutación que evita la traducción a proteína del resto del ARNm. La barra negra representa un oligonucleótido antisentido que evita la inclusión de ese exón en el ARNm maduro.

- 35 Figura 3. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido dirigidas al exón 3, que inducen una omisión exónica fuerte y consistente a una concentración de transfección de 10 nanomolar en células musculares humanas normales en cultivo.

- 40 Figura 4. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido dirigidas al exón 4, que inducen una omisión exónica fuerte y consistente a una concentración de transfección de 25 nanomolar en células musculares humanas normales en cultivo.

- Figura 5. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 5 humano fuerte y eficiente utilizando moléculas antisentido [H5A(+35+65)] dirigidas a un dominio interno del exón 5, presumiblemente un intensificador del corte y empalme del exón. Este compuesto preferente induce una omisión exónica consistente a una concentración de transfección de 25 nanomolar en células musculares humanas en cultivo.

- 45 Figura 6. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido dirigidas al exón 8, que induce una omisión exónica fuerte y consistente tanto del exón 8 como del exón 8/9 a una concentración de transfección de 10 nanomolar en células musculares humanas normales en cultivo.

- Figura 7. Electroforesis en gel que muestra diversos cócteles y moléculas antisentido individuales que inducen la omisión del exón 10 y exones circundantes. Una combinación de [H10A(-05+16)] y [H10A(+98+119)] o [H10A(-05+16)] y [H10A(+130+149)] induce la omisión del exón y de los exones 9-12, mientras que [H10A(-05+16)] por sí solo induce la omisión de los exones 9-14.

- Figura 8. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 14 utilizando la molécula antisentido H14A(+31+61) dirigida al exón 14.

- 55 Figura 9. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 17 utilizando la molécula antisentido H17A(+10+35) dirigida al exón 17.

- Figura 10. Electroforesis en gel que muestra dos cócteles de moléculas antisentido dirigidas al exón 26. El cóctel doble de [H26A(-07+19)] y [H26A(+24+50)] induce una buena omisión del exón 26 y la adición de una molécula antisentido adicional al cóctel no afecta a la eficiencia de la omisión.

- 60 Figura 11. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido dirigidas al exón 36, que inducen una omisión exónica fuerte y consistente a una concentración de transfección de 25 nanomolar en células musculares humanas normales en cultivo.

- Figura 12. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 43 fuerte y consistente a 25 nanomolar en células musculares humanas normales en cultivo utilizando la molécula antisentido H43A(+92+117).

- 65 Figura 13. Electroforesis en gel que muestra la dependencia de la dosis de la omisión del exón 55 utilizando la molécula antisentido H44A(+65+90).

- Figura 14. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 45 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H45A(-09+25).
- Figura 15. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 46 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H46A(+81+109).
- 5 Figura 16. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 47 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H47A(+01+29).
- Figura 17. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido dirigidas al exón 47 que inducen una omisión exónica fuerte y consistente.
- Figura 18. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 49 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H49A(+45+70).
- 10 Figura 19. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 50 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H50A(+48+74).
- Figura 20. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 51 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H51A(+66+95).
- 15 Figura 21. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 54 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H54A(+67+97).
- Figura 22. Electroforesis en gel que muestra una molécula antisentido H55A(-10+20) indujo una omisión del exón 55 dependiente de la dosis.
- Figura 23. Electroforesis en gel que muestra una omisión del exón 56 fuerte y consistente utilizando la molécula antisentido H56A(+92+121).
- 20 Figura 24. Electroforesis en gel que muestra una molécula antisentido H57A(-10+20) indujo una omisión del exón 57 dependiente de la dosis.
- Figura 25. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 59 y del exón 58/59 utilizando la molécula antisentido H59A(+96+120) dirigida al exón 59.
- 25 Figura 26. Electroforesis en gel que muestra dos cócteles diferentes que inducen la omisión exónica del exón 60.
- Figura 27. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 63 utilizando la molécula antisentido H63A(+20+49).
- Figura 28. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 64 utilizando la molécula antisentido H64A(+34+62).
- 30 Figura 29. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido dirigidas al exón 66 que inducen una omisión exónica dependiente de la dosis.
- Figura 30. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 67 utilizando la molécula antisentido H67A(+17+47).
- 35 Figura 31. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido dirigidas al exón 68 que inducen una omisión exónica dependiente de la dosis.
- Figura 32. Electroforesis en gel que muestra un 'cóctel' de moléculas antisentido que inducen una omisión exónica fuerte y consistente de los exones 69/70 a una concentración de transfección de 25 nanomolar.
- Figura 33. Electroforesis en gel que muestra diversos 'cócteles' de moléculas antisentido que inducen diversos niveles de omisión en el exón 50.
- 40 Figura 34. Electroforesis en gel que muestra un cóctel de tres moléculas antisentido que inducen una omisión eficiente de los exones 50/51.
- Figura 35. Gráfico de los resultados de densitometría que muestran diversas eficiencias de omisión exónica. Las moléculas antisentido sometidas a ensayo fueron: exón 3 [H3A(+30+60) y H3A(+61+85)], exón 4 [H4D(+14-11) y H4A(+11+40)], exón 14 [H14A(+32+61)], exón 17 [H17A(+10+35)], exón 26 [H26A(-07+19), H26A(+24+50) y H26A(+68+92)] y, exón 36 [H36A(-16+09) y H36A(+22+51)].
- 45 Figura 36. Gráfico de los resultados de densitometría que muestran diversas eficiencias de omisión exónica. Las moléculas antisentido sometidas a ensayo eran exón 46 [H46A(+81+109)], exón 47 [H47A(+01+29)], exón 48 [H48A(+01+28) y H48A(+40+67)], exón 49 [H49A(+45+70)].
- 50 Figura 37. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 11 utilizando la molécula antisentido H11A(+50+79).
- Figura 38. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 12 utilizando la molécula antisentido H12A(+30+57).
- Figura 39. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 44 utilizando la molécula antisentido H44A(+59+85).
- 55 Figura 40. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 45 utilizando la molécula antisentido H45A(-03+25).
- Figura 41. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 51 utilizando la molécula antisentido H51A(+71+100).
- 60 Figura 42. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 52 utilizando la molécula antisentido H52A(+09+38).
- Figura 43. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 53 utilizando la molécula antisentido H53A(+33+65).
- Figura 44. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 46 utilizando la molécula antisentido H46A(+93+122).
- 65

Figura 45. Electroforesis en gel que muestra la omisión del exón 73 utilizando la molécula antisentido H73A(+02+26).

Figura 46. Secuencias de las moléculas antisentido.

5 Descripción detallada

Breve descripción de los listados de secuencias

Table 1A: moléculas antisentido individuales

SEC ID	Exón	Secuencia
	<b>Exón 5</b>	
1	H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A
	<b>Exón 11</b>	
52	H11A(+50+79)	CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA
	<b>Exón 12</b>	
2	H12A(+52+75)	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA
53	H12A(+30+57)	CAG UCA UUC AAC UCU UUC AGU UUC UGA U
	<b>Exón 17</b>	
3	H17A(-07+23)	GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG
4	H17A(+61+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC
	<b>Exón 21</b>	
5	H21A(+86+114)	CAC AAA GUC AUC CAG GAA CAU GGG UC
6	H21A(+90+119)	AAG GCC AAG UCU GCA UCC AGG AAC AUG
	<b>Exón 22</b>	
7	H22A(+125+146)	CUG CAA UUC CCC GAG UCU CUG C
	<b>Exón 24</b>	
8	H24A(+51+73)	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC
	<b>Exón 43</b>	
9	H43A(+92+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UC
	<b>Exón 44</b>	
10	H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA
54	H44A(+59+85)	CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU
	<b>Exón 45</b>	
11	H45A(+09+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U
55	H45A(+03+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G
61	H45A(+06+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A
62	H45A(+12+25)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C
	<b>Exón 46</b>	
12	H46A(+81+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU
56	H46A(+93+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA
	<b>Exón 47</b>	
13	H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA
	<b>Exón 49</b>	
14	H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GCC CUU UAG ACA AAA UC
	<b>Exón 50</b>	
15	H50A(+48+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU
	<b>Exón 51</b>	
57	H51A(+71+100)	AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG
	<b>Exón 52</b>	
58	H52A(+09+38)	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC
	<b>Exón 53</b>	
59	H53A(+33+65)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU
	<b>Exón 54</b>	
16	H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G
	<b>Exón 55</b>	
17	H55A(-10 +20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA
	<b>Exón 56</b>	
18	H56A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU
19	H56A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU
	<b>Exón 57</b>	
20	H57A(-10+20)	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA

	<b>Exón 58</b>	
21	H58A(+34+64)	UUC GUA CAG UCU CAA GAG UAC UCA UGA UUA C
22	H58D(+17-07)	CAA UUA CCU CUG GGC UCC UGG UAG
	<b>Exón 59</b>	
23	H59A(+96 +120)	CUA UUU UUC UCU GCC AGU CAG CGG A
	<b>Exón 60</b>	
24	H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC
	<b>Exón 61</b>	
25	H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C
	<b>Exón 62</b>	
26	H62A(23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC
	<b>Exón 63</b>	
27	H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA
	<b>Exón 64</b>	
28	H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC AGU CC
	<b>Exón 66</b>	
29	H66A(-8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG
	<b>Exón 67</b>	
30	H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC
	<b>Exón 73</b>	
60	H73A(+02+26)	CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G

Tabla 1B: cócteles de moléculas antisentido

SEC ID	Exón	Secuencia
	Cócteles de exón 3	
31	H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G
32	H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC
	Cócteles de exón 4	
33	H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU
34	H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A
	Cócteles de exón 8	
35	H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA
36	H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A
	Cócteles de exón 10	
37	H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA
38	H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G
	Cócteles de exón 26	
39	H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC
40	H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC
41	H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G
	Cócteles de exón 36	
42	H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A
43	H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU
	Cócteles de exón 48	
44	H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C
45	H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUUU GAG C
	Cócteles de exón 60	
46	H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC
47	H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC
	Cócteles de exón 66	
48	H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU
49	H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC
	Cócteles de exón 68	
50	H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C
51	H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC

## Parte general

- 15 Los números de identificación de secuencias (SEC ID nº) que contienen información de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos incluidos en la presente memoria se recopilan al final de la descripción y se han preparado usando el programa PatentIn, versión 3.0. Cada secuencia de nucleótidos o aminoácidos está identificada en el listado de

secuencias mediante el indicador numérico <210> seguido de un identificador de secuencia (p. ej. <210>1, <210>2, etc.). La longitud, el tipo de secuencia y el organismo de origen para cada secuencia de nucleótidos o aminoácidos se indican mediante la información proporcionada en los campos de indicador numérico <211>, <212> y <213>, respectivamente. Las secuencias de nucleótidos o aminoácidos a las que se hace referencia en la especificación se definen mediante la información proporcionada en el campo de indicador numérico <400> seguido del identificador de secuencia (p. ej. <400>1, <400>2, etc.).

Se ha propuesto y publicado un sistema de nomenclatura de moléculas antisentido para distinguir entre las diferentes moléculas antisentido (véase Mann et al., (2002) J Gen Med 4, 644-654). Esta nomenclatura se hizo especialmente importante al someter a ensayo varias moléculas antisentido ligeramente diferentes, con diana todas en la misma región diana, como se muestra a continuación:

$$H \# A/D (x : y).$$

La primera letra designa la especie (p.ej., H: humana, M: murina, C: canina) "n<sup>o</sup>" designa el número de exón de distrofina diana.

"A/D" indica el sitio de corte y empalme donante o aceptor al principio y al final del exón, respectivamente.

(X y) representa las coordenadas de apareamiento, en las que "-" o "+" indican secuencias intrónicas o exónicas, respectivamente. Como ejemplo, A(-6+18) indicaría las últimas 6 bases del intrón que precede al exón diana y las primeras 18 bases del exón diana. El sitio de corte y empalme más cercano sería el aceptor, de modo que estas coordenadas irían precedidas por una "A". La descripción de coordenadas de apareamiento en el sitio de corte y empalme donante podría ser D(+2-18) en el que las últimas 2 bases exónicas y las primeras 18 bases intrónicas corresponden al sitio de apareamiento de la molécula antisentido. Las coordenadas de apareamiento totalmente exónico podrían representarse mediante A(+65+85), que es el sitio entre el 65<sup>o</sup> y el 85<sup>o</sup> nucleótido a partir del comienzo de ese exón.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "derivado" y "derivado de" se considerará que indican que puede obtenerse un entero específico a partir de una fuente concreta, *aunque* no resulta necesario que ello sea directamente a partir de esa fuente.

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un entero o grupo de enteros establecidos poro no la exclusión de cualquier otro entero o grupo de enteros.

Otras definiciones para los términos seleccionados usados en el presente documento pueden encontrarse dentro de la descripción detallada de la invención y aplicarse a lo largo de ella. A menos que se defina otra cosa, todos los demás términos científicos y técnicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece la invención.

#### Descripción de la realización preferente

En el caso de que una o más moléculas antisentido sean dirigidas a secuencias de nucleótidos que participan en el corte y empalme en exones dentro de las secuencias de pre-ARNm, el corte y empalme normal del exón puede inhibirse y causar que la maquinaria de corte y empalme evite los exones mutados enteros del ARNm maduro. El concepto de omisión exónica inducida por oligonucleótido antisentido se muestra en la figura 2.

En muchos genes, la delección de un exón entero conduciría a la producción de una proteína no funcional por la pérdida de dominios funcionales importantes o la disrupción del marco de lectura. Sin embargo, en algunas proteínas, resulta posible acortar la proteína mediante delección de uno o más exones del interior de la proteína sin interferir con el marco de lectura y sin alterar gravemente la actividad biológica de la proteína. Típicamente, dichas proteínas tienen un papel estructural o poseen dominios funcionales en sus extremos. La presente invención describe moléculas antisentido capaces de unirse a dianas específicas de pre-ARNm de distrofina y redirigir el procesamiento de ese gen.

Un objetivo preferente de una terapia basada en moléculas antisentido es conseguir la máxima omisión exónica proporcionando la concentración más baja posible de la molécula antisentido. En general, una molécula antisentido puede provocar una omisión exónica robusta fuerte, una omisión exónica esporádica o ninguna omisión exónica en absoluto. Resulta preferible desarrollar moléculas antisentido (solas o en combinación) que puedan proporcionar una omisión exónica consistentemente robusta fuerte a una dosis terapéutica baja.

#### Moléculas antisentido

Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un oligonucleótido antisentido que induce la omisión del exón

45 en un pre-ARNm de distrofina humana, en el que el oligonucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en:

- 5 i) un oligonucleótido antisentido de 22 bases que comprenden CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- ii) un oligonucleótido antisentido de 22 bases que comprende CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 10 iii) un oligonucleótido antisentido de 25 bases que comprende GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- iv) un oligonucleótido antisentido de 25 bases que comprende GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- v) un oligonucleótido antisentido de 28 bases que comprende GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- 15 vi) un oligonucleótido antisentido de 28 bases que comprende GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,
- vii) un oligonucleótido antisentido de 31 bases que comprende GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y
- viii) un oligonucleótido antisentido de 31 bases que comprende GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 Para inducir omisión exónica en los exones del transcrito del gen de la distrofina, las moléculas antisentido pueden seleccionarse del grupo de compuestos que se muestra en la Tabla 1A.

25 Se proporciona además una combinación o "cóctel" de dos o más oligonucleótidos antisentido capaces de unirse a una diana seleccionada para inducir omisión exónica. Para inducir omisión exónica en los exones del transcrito del gen de la distrofina, las moléculas antisentido en un "cóctel" se seleccionan preferentemente del grupo de compuestos que se muestra en la Tabla 1B.

30 El diseño de moléculas antisentido para enmascarar completamente los sitios de corte y empalme de consenso puede no generar necesariamente alguna omisión del exón diana. Además, los inventores han descubierto que el tamaño o la longitud del propio oligonucleótido antisentido no siempre es un factor importante durante el diseño de las moléculas antisentido. Con algunas dianas, tales como el exón 19, oligonucleótidos antisentido de tan solo 12 bases fueron capaces de inducir omisión exónica, aunque no de forma tan eficaz como oligonucleótidos más largos (de 20-31 bases). En algunas otras dianas, tales como el exón 23 de distrofina murina, oligonucleótidos antisentido de solo 17 restos de longitud fueron capaces de inducir una omisión más eficaz que otro compuesto solapante de 25 nucleótidos. Sin embargo, en la presente invención se ha encontrado generalmente que las moléculas antisentido más largas con frecuencia resultan más eficaces en la inducción de la omisión exónica que moléculas más cortas. De esta manera, preferentemente, las moléculas antisentido de la presente invención presentan una longitud de 24 a 30 ácidos nucleicos, preferentemente de aproximadamente 28 nucleótidos. Por ejemplo, se ha encontrado anteriormente que un oligonucleótido antisentido de 20 bases (H16A(-07+13)) resultaba ineficaz en la inducción de omisión del exón 16 pero que un oligonucleótido de 31 bases (H16A(-06+25)), que comprendía por completo el oligonucleótido más corto, resultaba eficaz en la inducción de omisión (Harding et al., Mol. Ther. 15:157-166, 2007).

45 Los inventores también han encontrado que aparentemente no existe ningún motivo estándar que pueda bloquearse o enmascararse mediante moléculas antisentido para redirigir el corte y empalme. En algunos exones, tales como el exón 23 de la distrofina de ratón, el sitio de corte y empalmen donante era el más fácilmente utilizable como diana para redirigir la omisión de ese exón. Hay que destacar que el diseño y el ensayo de una serie de moléculas antisentido específicas del exón 23 para aparearse con regiones solapantes del sitio de corte y empalme donante mostró una variación considerable en cuanto a la eficacia de la omisión exónica inducida. Como informan Mann et al., (2002) existe una variación significativa en la eficacia de la evitación de la mutación sin sentido dependiente del apareamiento de oligonucleótidos antisentido ("Improved antisense oligonucleotide induced exon skipping in the mdx mouse model of muscular dystrophy", J. Gen. Med. 4:644-654). No se encontró que la dirección hacia el sitio aceptor del exón 23 o a ciertos dominios internos indujera una omisión sistemática del exón 23.

55 En otros exones definidos como diana para la eliminación, el enmascaramiento del sitio de corte y empalme donante no indujo ninguna omisión exónica. Sin embargo, dirigiendo moléculas antisentido al sitio de corte y empalme aceptor (exón 8 humano, tal como se comenta posteriormente), se indujo una omisión exónica fuerte y mantenida. Hay que destacar que la delección del exón 8 humano estuvo fuertemente asociada con la eliminación conjunta del exón 9. No hay una fuerte homología de secuencia entre los oligonucleótidos antisentido del exón 8 y las regiones correspondientes del exón 9, de modo que no parece que sea una cuestión de reacción cruzada. Más bien, el corte y empalme de estos dos exones generalmente está relacionado. Éste no es un caso aislado, ya que se observa el mismo efecto en células caninas en las que la definición como diana del exón 8 para su eliminación también dio como resultado la omisión del exón 9. La definición como diana del exón 23 para su eliminación en el pre-ARNm de la distrofina del ratón también da como resultado, además, la eliminación frecuente del exón 22. Este efecto se produce de una manera dependiente de la dosis y también indica un procesamiento estrechamente coordinado de dos exones contiguos.

- 5 En otros exones diana, las moléculas antisentido dirigidas hacia los sitios de corte y empalme donantes o aceptores no indujeron o indujeron un nivel bajo de omisión exónica, mientras que el apareamiento de moléculas antisentido con regiones intraexónicas (es decir, intensificadores del corte y empalme exónico dentro del exón 4 de la distrofina humana) fue más eficaz en la inducción de omisión exónica. Algunos exones, por ejemplo, el exón 19, tanto de ratón como humano, son fácilmente omitidos mediante la dirección de moléculas antisentido hacia una variedad de motivos. Esto es, la omisión exónica dirigida se induce después del uso de oligonucleótidos antisentido para enmascarar los sitios de corte y empalme donante y aceptor o intensificadores del corte y empalme exónico.
- 10 Tampoco resulta posible predecir qué cócteles de moléculas antisentido inducirán la omisión exónica. Por ejemplo, la combinación de dos moléculas antisentido que, por sí mismas, inducen muy bien la omisión de un exón dado podría no causar omisión de un exón al combinarlas en un cóctel. Por ejemplo, cada una de H50A(+02+30) y H50A(+66+95) por sí misma indujo una buena omisión de los exones 50 y 51. Sin embargo, en combinación como cóctel, sólo indujeron un nivel bajo de omisión de los dos exones. De manera similar, la combinación de H50A(+02+30) y
- 15 H51A(+66+90) o H50A (+02+30) y H51A(+61+90) no causó una omisión eficiente de los exones 50 y 51, aunque las moléculas antisentido individuales eran eficaces. Sin embargo, la introducción de una tercera molécula antisentido [H51D(+16-07)] que por sí misma no causaba omisión, creó un cóctel de tres elementos ([H50A(+02+30)], H51A(+66+90) y [H51D(+16-07)]) que fue capaz de causar la omisión de los exones 50 y 51 a una concentración de tan sólo 1 nM.
- 20 Alternativamente, la combinación de dos o tres moléculas antisentido que resultan ineficaces o sólo moderadamente eficaces por sí mismas puede causar un excelente nivel de omisión en combinación. Por ejemplo, individualmente H26A(-07+19) [SEC ID nº 39], H26A(+24+50) [SEC ID nº 40] y H26A(+68+92) [SEC ID nº 41] causan una omisión ineficiente del exón 26 y también inducen la omisión exónica múltiple (26-29 o 27-30). Sin embargo, al combinar los
- 25 tres exones como cóctel, se produce una omisión altamente eficiente del exón 26.
- A partir de los ejemplos y análisis anteriormente proporcionados, resulta evidente que no existe ningún modo de predecir con precisión si una combinación funcionará o no.
- 30 Las moléculas antisentido pueden provocar la omisión de exones de una manera 'dependiente de dosis' o 'no dependiente de dosis'. La expresión 'dependiente de dosis' se refiere a que una cantidad más grande de la molécula antisentido induce una mejor omisión del exón, mientras que las moléculas antisentido no dependientes de dosis son capaces de inducir omisión incluso a dosis muy bajas. Por ejemplo, a partir de la figura 15 puede observarse que H46A(+81+109) [SEC ID nº 12] proporciona una omisión igualmente buena del exón 46 con independencia de la
- 35 cantidad de molécula antisentido presente (de 600 nM a 25 nM). En contraste, H57A(-10+20) [SEC ID nº 20] (figura 24) induce una fuerte omisión del exón 57 a 100 nM, pero una omisión reducida a 50 nM y una reducción incluso mayor de la omisión a 25 nM.
- 40 Resulta preferible seleccionar moléculas antisentido que induzcan omisión de una manera dependiente de dosis, ya que estas moléculas pueden administrarse a concentraciones muy bajas y todavía presentar un efecto terapéutico. Sin embargo, también resulta aceptable seleccionar como moléculas preferentes aquellas moléculas antisentido que induzcan omisión de una manera dependiente de dosis, particularmente si esas moléculas inducen omisión buena o excelente a concentraciones bajas. Preferentemente, las moléculas antisentido de la presente invención son capaces de inducir una omisión exónica buena o excelente a concentraciones inferiores a 500 nM, preferentemente inferiores
- 45 a 200 nM y más preferentemente de tan sólo 100 nM, 50 nM o incluso de 25 nM. Lo más preferentemente, las moléculas de oligonucleótido de la presente invención son capaces de inducir omisión a niveles superiores a 30% a una concentración de 100 nM.
- 50 Para identificar y seleccionar oligonucleótidos antisentido adecuados para su uso en la modulación de la omisión de exones, hay que identificar primero una secuencia de ácido nucleico cuya función sea ser modulada. Ésta puede ser, por ejemplo, un gen (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión esté asociada con un trastorno o estado patológico concreto, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. Dentro del contexto de la presente invención, el sitio o sitios diana preferentes son aquellos que participan en el corte y empalme del ARNm (es decir, sitios de corte y empalme donantes, sitios de corte y empalme aceptores, o elementos intensificadores del corte y
- 55 empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y las secuencias de reconocimiento o los intensificadores del corte y empalme exónicos también son potenciales sitios diana para la modulación del corte y empalme del ARNm.
- 60 Preferentemente, la presente invención presenta como objetivo proporcionar moléculas antisentido capaces de unirse a una diana seleccionada en el pre-ARNm de la distrofina para inducir una omisión exónica eficaz y consistente. La distrofia muscular de Duchenne aparece a partir de mutaciones que imposibilitan la síntesis de un producto funcional del gen de la distrofina. Estos defectos genéticos de la distrofia muscular de Duchenne son típicamente mutaciones sin sentido o reordenamientos genómicos tales como eliminaciones, duplicaciones o microdeleciones o inserciones que alteran el marco de lectura. Como el gen de la distrofina humana es un gen largo y complejo (con 79 exones que se cortan y empalman a la vez para generar un ARNm maduro con un marco de lectura abierto de aproximadamente
- 65

11.000 bases), hay muchas posiciones en las que pueden producirse estas mutaciones. En consecuencia, una terapia integral basada en oligonucleótidos antisentido para abordar muchas de las diferentes mutaciones causantes de enfermedad en el gen de la distrofina requerirá que puedan definirse como diana numerosos exones para su eliminación durante el proceso de corte y empalme.

Dentro del contexto de la presente invención, el sitio o sitios diana preferentes son aquellos que participan en el corte y empalme del ARNm (es decir, sitios de corte y empalme donantes, sitios de corte y empalme aceptores o elementos intensificadores del corte y empalme exónico). Los puntos de ramificación de corte y empalme y las secuencias de reconocimiento o los intensificadores del corte y empalme exónicos también son potenciales sitios diana para la modulación del corte y empalme del ARNm.

El oligonucleótido y el ADN o ARN son complementarios entre sí en el caso de que un número suficiente de posiciones correspondientes en cada molécula se encuentra ocupado por nucleótidos que pueden formar enlaces de hidrógeno entre sí. Por tanto, "hibridable de forma específica" y "complementario" son expresiones que se usan para indicar un grado de complementariedad de apareamiento preciso tal que se produzca una unión estable y específica entre el oligonucleótido y el ADN o ARN diana. Se entiende en la técnica que la secuencia de una molécula antisentido no necesita ser complementaria al 100 % a la de su secuencia diana para ser hibridable de forma específica. Una molécula antisentido es hibridable de forma específica en el caso de que la unión del compuesto a la molécula diana de ADN o ARN interfiere con la función normal del ADN o ARN diana para causar una pérdida de utilidad, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto antisentido a secuencias no diana en condiciones en las cuales se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o el tratamiento terapéutico, y en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en las cuales se realizan los ensayos

Aunque el método anterior puede usarse para seleccionar moléculas antisentido capaces de eliminar cualquier exón del interior de una proteína que es capaz de acortarse sin afectar a su función biológica, la eliminación del exón no debería conducir a un desplazamiento del marco de lectura en el ARNm transcrito acortado. Por tanto, si en una secuencia lineal de tres exones, el final del primer exón codifica dos o tres nucleótidos en un codón y el siguiente exón se elimina, entonces, el tercer exón de la secuencia lineal ha de empezar con un solo nucleótido que sea capaz de completar el triplete de nucleótidos para un codón. Si el tercer exón no comienza con un solo nucleótido, habrá un desplazamiento del marco de lectura que conduciría a la generación de una proteína truncada o no funcional.

Se apreciará que los codones organizados en los extremos de los exones en las proteínas estructurales no se rompen en todos los casos al final de un codón. En consecuencia, existe una necesidad de delecionar más de un exón del pre-ARNm para garantizar la lectura dentro del marco del ARNm. En tales circunstancias, puede ser necesario seleccionar una pluralidad de oligonucleótidos antisentido mediante el método de la invención, en el que cada uno se dirija a una región diferente responsable de la inducción de corte y empalme en los exones que se van a delecionar.

La longitud de una molécula antisentido puede variar con la condición de que sea capaz de unirse de forma selectiva a la localización pretendida dentro de la molécula de pre-ARNm. La longitud de dichas secuencias puede determinarse de acuerdo con los procesos de selección descritos en el presente documento. Generalmente, la molécula antisentido presentará entre aproximadamente 10 nucleótidos de longitud y aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. Sin embargo, se apreciará que puede usarse en el método cualquier longitud de nucleótidos dentro de este intervalo. Preferentemente, la longitud de la molécula antisentido presenta una longitud de 17 a 30 nucleótidos. Inesperadamente, se ha encontrado que las moléculas antisentido más largas con frecuencia resultan más eficaces en la inducción de omisión exónica. De esta manera, más preferentemente la molécula antisentido presenta una longitud de 24 a 30 nucleótidos.

A fin de determinar qué exones pueden estar conectados en un gen de distrofina, debería hacerse referencia a un mapa de límites exónicos. La conexión de un exón con otro está basada en los exones que poseen el mismo número en el límite 3' que el que está presente en el límite 5' del exón al que se está conectando. Por tanto, si se eliminase el exón 7, el exón 6 ha de conectar con los exones 12 o 18 para mantener el marco de lectura. Por tanto, resulta necesario seleccionar los oligonucleótidos antisentido que redirigieron el corte y el empalme para los exones 7 a 11 en el primer caso, o los exones 7 a 17 en el segundo caso. Otro planteamiento, en cierto modo más simple, para restaurar el marco de lectura alrededor de una eliminación del exón 7 sería eliminar los dos exones flanqueantes. La inducción de la omisión de los exones 6 y 8 daría como resultado un transcrito dentro del marco con el corte y empalme de los exones 5 a 9. En la práctica, sin embargo, la definición del exón 8 como diana para la eliminación del pre-ARNm da como resultado la eliminación conjunta del exón 9, de modo que el transcrito resultante tendría el exón 5 unido al exón 10. La inclusión o exclusión de exón 9 no altera el marco de lectura.

Una vez identificadas las moléculas antisentido que se van a someter a ensayo, se preparan de acuerdo con métodos estándares conocidos en la técnica. El método más común para producir moléculas antisentido es la metilación de la posición 2'-hidroxirribosa y la incorporación de un esqueleto fosforotioato. Ello produce moléculas que son superficialmente similares al ARN pero que son mucho más resistentes a la degradación por nucleasas.

Para evitar la degradación del pre-ARNm durante la formación de dúplex con las moléculas antisentido, las moléculas

- antisentido utilizadas en el método pueden adaptarse para reducir al mínimo o evitar el corte por ARNasa H endógena. Esta propiedad resulta altamente preferente, ya que la presencia de oligonucleótidos de ARN no metilados en un medio intracelular o en contacto con extractos en bruto que contienen ARNasa H conducirá a la degradación de los dúplex de pre-ARNm:oligonucleótido antisentido. Cualquier forma de molécula antisentido modificada que sea capaz de evitar o no inducir dicha degradación puede usarse en el presente método. La resistencia a nucleasas puede conseguirse mediante la modificación de las moléculas antisentido de la invención de manera que comprenda una cadena hidrocarburo alifática insaturada y uno o más grupos polares o con carga, incluyendo grupos ácido carboxílico, grupos éster y grupos alcohol.
- Un ejemplo de moléculas antisentido que, al formar dúplex con ARN, no resultan cortados por la ARNasa H son los derivados 2'-O-metilo. Los 2'-O-metil-oligorribonucleótidos son muy estables en el medio celular y en tejidos animales, y sus dúplex con ARN presentan valores de Tm más elevados que sus equivalentes ribo- o desoxirribo-. Alternativamente, las moléculas antisentido resistentes a nucleasas de la invención pueden presentar por lo menos uno de los últimos nucleótidos 3'-terminales fluorado. Todavía alternativamente, las moléculas antisentido resistentes a nucleasas de la invención presentan enlaces fosforotioato que unen por lo menos dos de las últimas bases nucleótidas 3'-terminales, preferentemente con enlaces fosforotioato uniendo las últimas cuatro bases nucleótidas 3'-terminales.
- Pueden generarse moléculas antisentido que no activan la ARNasa H de acuerdo con técnicas conocidas (véase, p. ej., la patente US nº 5.149.797). Tales moléculas antisentido, que pueden ser secuencias de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, contienen, simplemente, cualquier modificación estructural que obstaculice o evite de forma estérica la unión de la ARNasa H a una molécula dúplex que contenga el oligonucleótido como un miembro de la misma, cuya modificación estructural no obstaculice de forma sustancial o altere la formación de dúplex. Como las porciones del oligonucleótido que participa en la formación de dúplex son sustancialmente diferentes de las porciones que participan en la unión de ARNasa H al mismo, se dispone de numerosas moléculas antisentido que no activan la ARNasa H. Por ejemplo, dichas moléculas antisentido pueden ser oligonucleótidos en los que al menos uno, o todos los residuos fosfato formadores de puente entre nucleótidos son fosfatos modificados, tales como metilfosfonatos, metilfosforotioatos, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforamidatos. Por ejemplo, uno de cada dos de los residuos fosfato formadores de puente entre nucleótidos puede modificarse tal como se ha indicado.
- En otro ejemplo no limitante, tales moléculas antisentido son moléculas en las que por lo menos uno, o todos los nucleótidos contienen una fracción de alquilo inferior 2' (p. ej., alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>, lineal o ramificado saturado o insaturado, tal como metilo, etilo, etenilo, propilo 1-propenilo 2-propenilo e isopropilo). Por ejemplo, uno de cada dos de los nucleótidos puede modificarse tal como se ha indicado.
- Aunque los oligonucleótidos antisentido son una forma preferente de moléculas antisentido, la presente invención comprende otras moléculas antisentido oligoméricas, incluyendo, aunque sin limitarse a ellas, miméticos de oligonucleótido tales como los indicados posteriormente.
- Entre los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferentes que resultan útiles en la presente invención se incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces no naturales entre nucleósidos. Tal como se define en esta especificación, los oligonucleótidos que presentan esqueletos modificados incluyen los que conservan un átomo de fósforo en el esqueleto y los que no presentan un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de la presente memoria y tal como se menciona a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido también se considera que son oligonucleósidos.
- En otros miméticos de oligonucleótido preferentes, tanto el azúcar como el enlace entre nucleósidos, es decir, el esqueleto de unidades nucleótidas, se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana adecuado de ácidos nucleicos. Uno de dichos compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido peptidonucleico (APN). En los compuestos de APN, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en concreto, un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la parte amida del esqueleto.
- Los oligonucleótidos modificados pueden contener además uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de las nucleobases (a las que se suele hacer referencia en la técnica simplemente como "bases"). Determinadas nucleobases resultan particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Entre ellas se incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2-sustituidas, N-6-sustituidas y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico hacia 0,6-1,2 °C y actualmente son las sustituciones de base preferidas, aún más concretamente cuando se combinan con modificaciones 2'-O-metoxietilo de azúcar.
- Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica unir químicamente al oligonucleótido uno o más fracciones o conjugados que potencian la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Entre tales fracciones se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, fracciones de lípidos, tales como una fracción de

colesterol, ácido cólico, un tioéter, p. ej., hexil-S-tritilitiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, p. ej., residuos de dodecanodiol o undecilo, un fosfolípido, p. ej., di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido adamantano-acético, una fracción palmitilo, o una fracción octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

5 No resulta necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen uniformemente y de hecho puede incorporarse más de una de las modificaciones anteriormente indicadas en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de esta invención, son moléculas antisentido, concretamente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, formadas cada una de al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente por lo menos una región en la que el oligonucleótido se modifica con el fin de conferir de esa forma la resistencia incrementada a la degradación por nucleasas, una captación celular aumentada, y una región adicional para la afinidad de unión incrementada para el ácido nucleico diana.

#### 15 Métodos de preparación de moléculas antisentido

Las moléculas antisentido usadas de acuerdo con esta invención pueden prepararse de forma conveniente y rutinaria a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis son comercializados por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Un método para sintetizar oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado se describe en la patente US nº 4.458.066.

25 Puede emplearse de forma adicional o alternativa cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien conocida la utilización de técnicas similares para preparar oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. En una de dichas realizaciones automatizadas, se usan dietilfosforamiditas como materiales de partida y pueden sintetizarse tal como describen Beaucage et al., Tetrahedron Letters 22:1859-1862, 1981.

Las moléculas antisentido de la invención se sintetizan *in vitro* y no incluyen composiciones antisentido de origen biológico, o constructos de vectores genéticos diseñados para dirigir la síntesis *in vivo* de moléculas antisentido. Las moléculas de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otra forma con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como, por ejemplo, formulaciones de liposomas, de moléculas dirigidas hacia receptores, orales, rectales, tópicos u otras, para colaborar en la captación, distribución y/o absorción.

#### 35 Agentes terapéuticos

La presente invención puede utilizarse además como profiláctica o terapéutica, con fines de tratamiento de la distrofia muscular.

40 Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona moléculas antisentido que se unen a una diana seleccionada en el pre-ARNm de la distrofina para inducir la omisión exónica eficaz y consistente descrita en la presente memoria en una cantidad terapéuticamente eficaz, mezclada con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

45 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que son fisiológicamente tolerables y no producen típicamente una reacción alérgica o u otro tipo de reacción adversa similar, tal como molestia gástrica y similar, al administrarlas en un paciente. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los originados en petróleo, y de origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones de agua o salinas y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol se emplean preferentemente como portadores, particularmente para soluciones inyectables. En Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, se describen portadores farmacéuticos adecuados.

55 En una forma más específica de la invención se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden cantidades terapéuticamente eficaces de una molécula antisentido junto con diluyentes, conservantes, solubilizadores, emulsionantes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables. Tales composiciones incluyen diluyentes con diverso contenido de tampones (p. ej., Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, y aditivos tales como detergentes y agentes solubilizadores (p. ej., Tween-80, polisorbato-80), antioxidantes (p. ej., ácido ascórbico, metabisulfito sódico, conservantes (p. ej., timerosal, alcohol bencilico) y sustancias de carga (p. ej., lactosa, manitol). El material puede incorporarse en preparaciones particuladas de compuestos poliméricos, tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc. o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico. Tales composiciones pueden influir sobre el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo*, y la tasa de lavado vivo de las proteínas y derivados presentes. Véase, p. ej., Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435 a 1712, las cuales se incorporan como referencia en la presente memoria. Las composiciones líquidas pueden prepararse en forma líquida, o pueden estar en polvo deshidratado, tal como en forma liofilizada.

Se apreciará que las composiciones farmacéuticas proporcionadas según la presente invención pueden administrarse mediante cualquiera de los medios conocidos en la técnica. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas para su administración se administran mediante inyección, por vía oral, o mediante vía pulmonar o nasal. Las moléculas antisentido se administran más preferentemente por vías de administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea.

Terapia basada en moléculas antisentido

La presente invención también se refiere a la utilización de las moléculas antisentido de la presente invención, para la preparación de un medicamento para la modulación de una distrofia muscular.

La administración de una cantidad terapéuticamente útil de moléculas antisentido puede lograrse mediante métodos publicados previamente. Por ejemplo, la administración intracelular de la molécula antisentido puede ser a través de una composición que comprende una mezcla de la molécula antisentido y una cantidad eficaz de un copolímero en bloque. Un ejemplo de este método se describe en la solicitud de patente US nº 2004/0248833.

Otros métodos de administración de moléculas antisentido en el núcleo se describen en Mann C.J. et al., ["Antisense-induced exon skipping and the synthesis of dystrophin in the mdx mouse", Proc., Natl. Acad. Science 98(1):42-47, 2001] y en Gebiski et al., Human Molecular Genetics, 12(15): 1801-1811, 2003).

En la patente US nº 6.806.084 se describe un método para introducir una molécula de ácido nucleico en una célula por medio de un vector de expresión, bien como ADN desnudo, o bien en complejo con portadores lipídicos.

Puede ser deseable administrar la molécula antisentido en un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen complejos de macromoléculas, nanocápsulas, microesferas, perlas, y sistemas a base de lípidos incluyendo emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, y liposomas o formulaciones de liposomas.

Los liposomas son vesículas de membrana artificial que son útiles como vehículos de administración *in vitro* e *in vivo*. Estas formulaciones pueden tener características de carga neta catiónica, aniónica o neutra y son características útiles con los métodos de administración *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo*. Se ha demostrado que las vesículas unilaminares grandes (VUG), cuyo tamaño oscila desde 0,2-4,0  $\mu$ m pueden encapsular un porcentaje sustancial de un tampón acuoso que contiene macromoléculas grandes. El ARN y el ADN pueden encapsularse dentro del interior acuoso y administrarse en las células en una forma biológicamente activa (Fraley et al., Trends Biochem. Sci. 6:77, 1981).

Para que un liposoma sea un vehículo de transferencia génica eficaz, deberían estar presentes las características siguientes: (1) encapsulado de la molécula antisentido de interés con una alta eficacia, al tiempo que no se compromete su actividad biológica, (2) unión a una célula diana preferente y sustancial en comparación con células no diana, (3) administración del contenido acuoso de la vesícula en el citoplasma de la célula diana con una alta eficiencia, y (4) expresión precisa y eficaz de la información genética (Mannino et al., Biotechniques 6:682, 1988).

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

Alternativamente, el constructo antisentido puede combinarse con otros portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables para producir una composición farmacéutica. Los vehículos y diluyentes adecuados incluyen soluciones salinas isotónicas, por ejemplo tampón fosfato salino. La composición puede formularse para la administración parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, intraocular, oral o transdérmica.

Las vías de administración descritas pretenden ser únicamente una guía, puesto que el experto en la materia será capaz de determinar fácilmente la vía de administración óptima y cualquier dosis para cualquier animal y condición particular.

Las moléculas antisentido de la invención comprenden cualesquiera sales, ésteres, o sales de dichos ésteres, farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro compuesto que, tras la administración en un animal incluyendo un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito o residuo biológicamente activo del mismo. Por consiguiente, por ejemplo, la exposición se refiere además a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención, a sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y a otros bioequivalentes.

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos de la invención: es decir, sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto parental y no confieren efectos toxicológicos indeseables a éste.

Para los oligonucleótidos, entre los ejemplos preferentes de sales farmacéuticamente aceptables se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, (a) sales formadas con cationes, tales como sodio, potasio, amonio, magnesio, calcio, poliaminas tales como espermina y espermidina, etc., (b) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares, (c) sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido maleico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido alginico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido poligalacturónico, y similares, y (d) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloro, bromo y yodo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de una serie de formas dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y de la zona que se va a tratar. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y en membranas mucosas, incluyendo la administración rectal), pulmonar, p. ej., mediante inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, (incluyendo mediante nebulizador, intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye la inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o la administración intracraneal, p. ej., intratecal o intraventricular. Se cree que los oligonucleótidos con al menos una modificación 2'-O-metoxietilo resultan particularmente útiles para la administración oral.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Entre dichas técnicas se incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el portador o portadores o excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación uniforme e íntima los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, en caso necesario, dando forma al producto.

#### Kits de la invención

En la presente memoria se enseñan además kits para el tratamiento de un paciente con una enfermedad genética, donde los kits comprenden por lo menos una molécula antisentido, envasada en un recipiente adecuado, junto con instrucciones de utilización.

Los kits pueden contener por lo menos una molécula antisentido tales como las mostradas en la Tabla 1A, o un cóctel de moléculas antisentido tales como los mostrados en la Tabla 1B. Los kits pueden contener además reactivos periféricos tales como tampones, estabilizantes, etc.

El contenido del kit puede liofilizarse y el kit puede contener adicionalmente un solvente adecuado para la reconstitución de los componentes liofilizados. Los componentes individuales del kit pueden envasarse en recipientes separados y, asociados a tales envases, puede encontrarse un impreso en la forma prescrita por una agencia reguladora de la fabricación, utilización o comercialización de los farmacéuticos o productos biológicos, donde el impreso refleje la autorización de la agencia respecto de la fabricación, utilización o comercialización para la administración en el ser humano.

En el caso de que los componentes del kit se proporcionen en una o más soluciones líquidas, la solución líquida puede ser una solución acuosa, por ejemplo una solución acuosa estéril. Para la utilización *in vivo*, el constructo de expresión puede formularse en una composición inyectable con jeringa farmacéuticamente aceptable. En este caso, los medios recipientes pueden ser ellos mismos un inhalador, jeringa, pipeta, cuentagotas u otro aparato similar, a partir del cual puede aplicarse la formulación en una zona afectada del animal, tal como los pulmones, inyectarse en un animal o incluso aplicarse y mezclarse con los demás componentes del kit.

Los componentes del kit pueden proporcionarse también en formas secas o liofilizadas. En el caso de que los reactivos o componentes se proporcionen en forma seca, la reconstitución generalmente se lleva a cabo mediante la adición de un solvente adecuado. Se encuentra contemplado que el solvente se proporcione además en otros medios recipientes. Con independencia del número o tipo de envases, los kits de la invención pueden comprender además, o pueden envasarse con, un instrumento de ayuda a la inyección/administración o aplicación de la composición compleja final dentro del cuerpo de un animal. Tal instrumento puede ser un inhalador, jeringa, pipeta, pinza, cuchara medidora, cuentagotas o cualquier otro vehículo similar de administración autorizado para el uso clínico.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos sirven para describir de forma más completa la manera de usar la invención descrita anteriormente, así como para exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven en modo alguno para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que se presentan más bien con fines ilustrativos.

Los métodos de clonación molecular, inmunología y química de proteínas que no se describen de forma explícita en los siguientes ejemplos, están publicados en la bibliografía y son conocidos por el experto en la materia. Los textos

generales que describieron técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y de ADN recombinante dentro de la experiencia de la técnica incluyeron, por ejemplo: Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; Glover ed., *DNA Cloning: A Practical Approach*, volúmenes I y II, MRL Press, Ltd., Oxford, R.U., 1985; y Ausubel F., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates/Wiley Intersciences, New York, 2002.

Determinación de la omisión exónica inducida en células musculares humanas

10 Los intentos de los inventores de desarrollar un abordaje racional en el diseño de moléculas antisentido no tuvieron un éxito completo, ya que aparentemente no se observaba una tendencia sistemática que pudiera aplicarse a todos los exones. Como tal, la identificación de los compuestos de moléculas antisentido más eficaces, y por lo tanto más terapéuticos, ha sido el resultado de estudios empíricos.

15 Estos estudios empíricos implicaron el uso de programas informáticos para identificar motivos potencialmente implicados en el proceso de corte y empalme. Se usaron también otros programas informáticos para identificar regiones del pre-ARNm que podrían no haber tenido una estructura secundaria extensa y, por tanto, que eran sitios potenciales de apareamiento de moléculas antisentido. No se probó que ninguno de estos planteamientos fuese completamente fiable en el diseño de oligonucleótidos antisentido para la inducción fiable y eficaz de omisión exónica.

20 Se seleccionaron para su examen sitios de apareamiento del pre-ARNm de la distrofina humana, sobre la base inicial de los motivos o regiones conocidos o predichos implicados en el corte y empalme. Se diseñaron oligonucleótidos antisentido 2-O-Me para ser complementarios a las secuencias diana en investigación, y se sintetizaron en un sintetizador de ácidos nucleicos Expedite 8909. Tras la finalización de la síntesis, los oligonucleótidos se escindieron de la columna de soporte y se desprotegeron en hidróxido de amonio antes de desalarse. La calidad de la síntesis de oligonucleótidos se controló mediante la intensidad de las señales de tritilo después de cada etapa de desprotección durante la síntesis, detectada en el registro de síntesis. La concentración de oligonucleótido antisentido se estimó midiendo la absorbancia a 260 nm de una alícuota diluida.

25 Se ensayó entonces la capacidad de cantidades especificadas de moléculas antisentido para su capacidad de inducir omisión exónica en un ensayo *in vitro*, tal como se describe a continuación.

30 Brevemente, se prepararon cultivos primarios de mioblastos normales a partir de biopsias de músculo humano obtenidas tras consentimiento informado. Las células se propagaron y se les permitió diferenciarse en miotubos usando técnicas de cultivo convencionales. A continuación, las células se transfectaron con los oligonucleótidos antisentido mediante la administración de los oligonucleótidos en las células en forma de lipoplejos catiónicos, mezclas de moléculas antisentido o preparaciones liposómicas catiónicas.

35 Seguidamente las células se dejaron crecer durante otras 24 horas y después se extrajo el ARN total y se comenzó el análisis molecular. Se llevó a cabo una amplificación con transcriptasa inversa (RT-PCR) para estudiar las regiones diana del pre-ARNm de la distrofina o los reordenamientos exónicos inducidos.

40 Por ejemplo, en el ensayo de la inducción de omisión del exón 19 por una molécula antisentido, la RT-PCR escaneó varios exones para detectar la participación de cualquiera de los exones contiguos. Por ejemplo, al inducir la omisión del exón 19, la RT-PCR se llevó a cabo con cebadores que amplificaban a lo largo de los exones 17 y 21. También se llevaron a cabo amplificaciones de productos aún más largos en esta zona (es decir, los exones 13-26) para asegurar que hubiera un sesgo de amplificación mínimo para el transcrito omitido inducido más corto. Los productos más cortos o de exón omitido tienden a amplificarse de forma más eficaz y pueden sesgar la estimación del transcrito normal e inducido.

45 Los tamaños de los productos de la reacción de amplificación se estimaron en un gel de agarosa y se compararon frente a patrones de tamaño apropiados. La confirmación final de la identidad de estos productos se llevó a cabo mediante secuenciación directa del ADN para establecer que se habían mantenido las conexiones de exón correctas o esperadas.

50 Una vez se había inducido una omisión exónica eficaz con una molécula antisentido, las moléculas antisentido solapantes posteriores pudieron sintetizarse y seguidamente evaluarse en el ensayo tal como se ha indicado anteriormente. La definición de los presentes inventores de una molécula antisentido eficaz es una que induce una omisión exónica fuerte y mantenida a concentraciones de transfección del orden de 300 nM o inferiores. Lo más preferentemente, las moléculas de oligonucleótido de la presente invención son capaces de inducir omisión a niveles superiores a 30% a una concentración de 100 nM.

Métodos densitométricos

65 Se llevó a cabo el análisis de densitometría de los resultados de los procedimientos de omisión exónica con el fin de determinar qué moléculas antisentido alcanzaban la eficiencia deseada. Los productos de amplificación se

fraccionaron en geles de agarosa al 2%, se tiñeron con bromuro de etidio y las imágenes se capturaron mediante un sistema de documentación en gel Chemi-Smart 3000 (Vilber Lourmat, Marne La Vallee). A continuación, se analizaron las bandas utilizando el sistema de documentación en gel (Bio-Profil, Bio-1D versión 11.9, Vilber Lourmat, Marne La Vallee), siguiendo las instrucciones del fabricante.

5

Se llevó a cabo la densitometría en las moléculas antisentido siguientes:

**Figura 35**

Exón 3	H3A(+30+60) y H3A(+61+85)
Exón 4	H4D(+14-11) y H4A(+11+40)
Exón 14	H14A(+32+61)
Exón 17	H17A(+10+35)
Exón 26	H26A(-07+19), H26A(+24+50) y H26A(+68+92)
Exón 36	H36A(-16+09) y H36A(+22+51)

10

**Figura 36**

Exón 46	H46A(+81+109)
Exón 47	H47A(+01+29)
Exón 48	H48A(+01+28) y H48A(+40+67)
Exón 49	H49A(+45+70)

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 17

15

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 17 y se sometió a ensayo su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

20

A partir de la Tabla 2, posteriormente, puede observarse que el efecto de las moléculas antisentido dirigidas al mismo sitio (el sitio de corte y empalme del exón 17) puede ser muy diferente, aunque los sitios de unión de las dos moléculas antisentido sean solapantes. H17A(-07+23) [SEC ID nº 3], que se hibrida con las últimas 7 bases del intrón 16 y las primeras 23 bases del exón 17, induce la omisión del exón 17 al administrarlo en la célula a una concentración de 25 nM. En contraste, la molécula antisentido H17A(-12+18), que se hibrida con las últimas 12 bases del intrón 16 y las primeras 18 bases del exón 17, y de esta manera se solapa con el sitio de unión de H17A(-07+23), no fue capaz de inducir la omisión exónica en absoluto. Además, H17A(-07+16), que se hibrida con las últimas 7 bases del intrón 16 y las primeras 16 bases del exón 17, causó la omisión de tanto el exón 17 como el 18 a 200 nM. La molécula antisentido H17A(+61+86) [SEC ID nº 4], que se une en un motivo intensificador de corte y empalme intraexónico del exón 17 también es capaz de inducir un buen nivel de omisión. Puede observarse que la capacidad de las moléculas antisentido de inducir la omisión exónica no puede predecirse simplemente a partir de su sitio de unión y debe determinarse mediante ensayos rigurosos.

30

Tabla 2: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 17

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H17A(-12 +18)	GGU GAC AGC CUG UGA AAU CUG UGA GAA GUA	Sin omisión
H17A(-07+23)	GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG	Omisión a 25 nM
H17A(-07+16)	UGA CAG CCU GUG AAA UCU GUG AG	Omisión ex 17+18 a 200 nM
H17A(+10 +35)	AGU GAU GGC UGA GUG GUG GUG ACA GC	Omisión a 50 nM
H17A(+31+50)	ACA GUU GUC UGU GUU AGU GA	Omisión inconsistente
H17A(+61+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC	Omisión a 50 nM
H17A(+144+163)	CAG AAU CCA CAG UAA UCU GC	Omisión a 300 nM

35

Estos datos demuestran que algunas moléculas antisentido particulares inducen una omisión exónica eficiente, mientras que otras moléculas antisentido, con diana en regiones próximas o solapantes, pueden ser mucho menos eficientes. Los estudios de titulación muestran que una molécula es capaz de inducir una omisión exónica dirigida a una concentración de 20-25 nM, mientras que una molécula antisentido menos eficiente podría inducir omisión exónica únicamente a concentraciones de 300 nM y superiores. Por lo tanto, los presentes inventores han demostrado que dirigir las moléculas antisentido a motivos que participan en el proceso de corte y empalme desempeña un papel crucial en la eficacia global de ese compuesto.

Eficacia se refiere a la capacidad de inducir una omisión consistente de un exón diana. Sin embargo, en ocasiones la omisión de los exones diana está consistentemente asociada a un exón flanqueante. Es decir, los presentes inventores han encontrado que el corte y empalme de algunos exones se encuentra estrechamente ligado. Por ejemplo, al utilizar como diana el exón 23 en el modelo de ratón de distrofia muscular con moléculas antisentido dirigidas al sitio donante de ese exón, con frecuencia se detectan los exones 22 y 23 faltantes de transcritos de distrofina. A título de otro ejemplo, al utilizar una molécula antisentido dirigida al exón 8 del gen de la distrofina humana, muchos transcritos inducidos no presentan tanto el exón 8 como el exón 9.

- 5
- 10 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 2
- Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 2 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

- 15 Tabla 3: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 2

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H2A(-14+10)	UCU CUU UCA UCU AAA AUG CAA AAU	Sin omisión
H2A(-1+23)	CUU UUG AAC AUC UUC UCU UUC AUC	Sin omisión
H2A(+7+38)	UUU UGU GAA UGU UUU CUU UUG AAC AUC UUC UC	Sin omisión
H2A(+16+39)	AUU UUG UGA AUG UUU UCU UUU GAA	Sin omisión
H2A(+30+60)	UAG AAA AUU GUG CAU UUA CCC AUU UUG UGA A	Sin omisión
H2D(+19-11)	ACC AUU CUU ACC UUA GAA AAU UGU GCA UUU	Sin omisión
H2D(+03-21)	AAA GUA ACA AAC CAU UCU UAC CUU	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 3

- 20 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 3 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.
- 25 Utilizada cada una individualmente, las moléculas antisentido H3A(+30+60) [SEC ID nº 31] y H3A(+61+85) [SEC ID nº 32] indujeron la omisión del exón 3. Sin embargo, en combinación, las dos moléculas son todavía más eficaces en la inducción de omisión (figura 3) y también son capaces de inducir omisión de los exones 4 y 5 a 300 nM y 600 nM, un resultado no observado o predicho por los resultados de la utilización de cada molécula antisentido por sí sola. Aparecen productos adicionales sobre el exón 3 omitido del transcrito inducido a partir de la amplificación de cebadores externos de contaminación cruzada de la RT-PCR, así como la formación de heterodúplex.

Tabla 4: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 3

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H3A(+14+38)	AGG UCA CUG AAG AGG UUC UCA AUA U	Omisión moderada a 10 nM
H3A(+20+40)	GUA GGU CAC UGA AGA GGU UCU	Omisión fuerte a 50 nM
H3A(+25+60)	AGG AGG CGU CUC CCA UCC UGU AGG UCA CUG AAG AG	Omisión débil
H3A(+45+65)	AGG UCU AGG AGG CGC CUC CCA	Sin omisión
H3A(+48+73)	CUU CGA GGA GGU CUA GGA GGC GCC UC	Sin omisión
H3A(+61+85)	GCC CUG UCA GGC CUU CGA GGA GGU C	Omisión a 300 nM
H3D(+17-08)	uca cau acA GUU UUU GCC CUG UCA G	Sin omisión
H3D(+19-02)	UAC AGU UUU UGC CCU GUC AGG	Sin omisión
H3D(+14-10)	AAG UCA CAU ACA GUU UUU GCC CUG	Sin omisión
H3D(+12-07)	UCA CAU ACA GUU UUU GCC C	Sin omisión
Cócteles para el exón 3		
H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G	Omisión excelente hasta 100 nM, omisión a 10 nM. También extraen 4 y 5 a 300 nM
H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GUC	
H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC	Omisión muy fuerte a 50 nM
H3A(+30+54)	GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G	
H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC	Omisión muy fuerte a 50 nM
H3A(+25+60)	AGG AGG CGU CUC CCA UCC UGU AGG UCA CUG AAG AG	

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 4

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 4 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. La figura 4 muestra la omisión del exón 4 utilizando un cóctel de H4A(+11+40) [SEC ID nº 33] y H4D(+14-11) [SEC ID nº 34].

Tabla 5: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 4

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H4A(-08+17)	GAU CCU UUU UCU UUU GGC UGA GAA C	Omisión débil bajando hasta 10 nM
H4A(+36+60)	CCG CAG UGC CUU GUU GAC AUU GUU C	Buena omisión a 10 nM
H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A	Omisión muy baja a 10 nM
Cócteles de exón 4		
H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG AUC CUU	Omisión excelente (100% a 100 nM) y buena omisión bajando hasta 5 nM
H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC UGC A	

- 10 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 5
- 15 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 5 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. H5D(+26-05) se consideraría una molécula antisentido no preferente ya que no consiguió inducir ni siquiera un nivel bajo de omisión del exón 5. Sin embargo, se evaluó H5A(+35+65) [SEC ID nº 1], que presumiblemente presenta como diana un intensificador de corte y empalme exónico, se encontró que era altamente eficiente en la inducción de omisión de dicho exón diana, tal como se muestra en la figura 5 y se considera el compuesto preferente para la omisión inducida del exón 5.

Tabla 6: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 5

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A	Omisión elevada hasta 10 nM
H5D(+26-05)	CUU ACC UGC CAG UGG AGG AUU AUA UUC CAA A	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 6

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 6 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

5 Tabla 7: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 6

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H6A(-09+17)	UUC AUU ACA UUU UUG ACC UAC AUG UG	Débil hasta 600 nM
H6A(+32+57)	CUU UUC ACU GUU GGU UUG UUG CAA UC	Omisión a 25 nM
KH9 6A(+66+94)	AAU UAC GAG UUG AUU GUC GGA CCC AGC UC	Omisión a 25 nM
H6A(+69+96)	AUA AUU ACG AGU UGA UUG UCG GAC CCA G	Omisión hasta 100 nM
H6A(+9B+123)	GGU GAA GUU GAU UAC AUU AAC CUG UG	Sin omisión
H6D(+18-06)	UCU UAC CUA UGA CUA UGG AUG AGA	Sin omisión
H6D(+07-15)	CAG UAA UCU UCU UAC CUA UGA C	Sin omisión
H6D(+07-16)	UCA GUA AUC UUC UUA CCU AUG AC	Sin omisión
H6D(+04-20)	UGU CUC AGU AAU CUU CUU ACC UAU	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 7

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 7 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 8: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 7

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H7A(-07+15)	UCA AAU AGG UCU GGC CUA AAA C	Sin omisión
H7A(-03+18)	CCA GUC AAA UAG GUC UGG CCU A	Sin omisión
H7A(+41+63)	UGU UCC AGU CGU UGU GUG GCU GA	Omisión 50 nM
H7A(+41+67)	UGC AUG UUC CAG UCG UUG UGU GGC UGA	omisión 25 nM
H7A(+47+74)	UGU UGA AUG CAU GUU CCA GUC GUU GUG U	Omisión 25 nM, aunque débil
H7A(+49+71)	UGA AUG CAU GUU CCA GUC GUU GU	Buena omisión hasta 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 8

15 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 8 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 6.

20 Tabla 9: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 8

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H8A(-10+20)	UGG AUA GGU GGU AUC AAC AUC UGU AAG CAC	Omisión muy débil de 8+9 hasta 10 nM
H8A(-07+15)	GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG U	Omisión extremadamente débil de 8+9 hasta 10 nM
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	Omisión débil de 8+9 hasta 10 nM
H8A(-04+18)	GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG U	Efecto fuerte hasta 40 nM
H8A(+42+66)	AAA CUU GGA AGA GUG AUG UGA UGU A	Buen nivel de omisión de 8+9 hasta 10 nM
H8A(+57+83)	GCU CAC UUG UUG AGG CAA AAC UUG GAA	Buena omisión de 8+9 a conc. elevada, bajando hasta 10 nM
HBA(+96+120)	GCC UUG GCA ACA UUU CCA CUU CCU G	Omisión débil de 8+9 hasta 300 nM
H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A	Omisión débil de 8+9 hasta 100 nM
HBD(+13-12)	UAC ACA CUU UAC CUG UUG AGA AUA G	Omisión débil de 8+9 hasta 50 nM
Cócteles de exón 8		
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	Buena omisión hasta 10 nM (8+9) aunque también 8 solo
H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A	
H8A(-06+24)	UAU CUG GU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	Buena omisión hasta 10 nM (8+9) aunque también 8 solo

H8D(+13-12)	UAC ACA CUU UAC CUG UUG AGA AUA G	
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	Buena omisión hasta 10 nM (8+9) aunque también 8 solo
H8A(+57+83)	GCU CAC UUG UUG AGG CAA AAC UUG GAA	
H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA	Buena omisión hasta 10 nM (8+9) aunque también 8 solo
H8A(+96+120)	GCC UUG GCA ACA UUU CCA CUU CCU G	

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 9

5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 9 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 10: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 9

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H9A(+154+184)	AGC AGC CUG UGU GUA GGC AUA GCU CUU GAA U	Efecto fuerte hasta 100 nM
H9D(+26-04)	AGA CCU GUG AAG GAA AUG GGC UCC GUG UAG	Efecto fuerte hasta 200 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 10

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 10 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Ver la figura 7 para ejemplos de una molécula oligonucleótido antisentido individual y cócteles que inducen la omisión de exón 10 y exones circundantes. Molécula oligonucleótido antisentido individual H10A(-05+16) [SEC ID nº 37]: fue capaz de inducir la omisión de los exones 9 a 14, mientras que la combinación con H10A(+98+119) [SEC ID nº 38] fue capaz de inducir la omisión del exón 10 solo y los exones 9 a 12 (y cierta omisión de los exones 10 a 12). La combinación de H10A(-05+16) y H10A(+130+149) fue capaz de inducir la omisión del exón 10 y de los exones 9 a 12.

20 Tabla 11: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 10

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H10A(-09+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA CAA U	Sin omisión
H10A(+08+27)	UGA CUU GUC UUC AGG AGC UU	Sin omisión
H10A(+21+42)	CAA UGA ACU GCC AAA UGA CUU G	Omisión a 100 nM
H10A(+27+51)	ACU CUC CAU CAA UGA ACU GCC AAA U	Sin omisión
H10A(+55+79)	CUG UUU GAU AAC GGU CCA GGU UUA C	Sin omisión
H10A(+80+103)	GCC ACG AUA AUA CUU CUU CUA AAG	Sin omisión
H10D(+16-09)	UUA GUU UAC CUC AUG AGU AUG AAA C	Sin omisión
Cócteles de exón 10		
H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA	
H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G	Omisión fuerte a 200 nM
H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA	
H10A(+130+149)	UUA GAA AUC UCU CCU UGU GC	Omisión a 200 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 11

25 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 11 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 37.

Tabla 12: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 11

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H11A(-07+13)	CCA UCA UGU ACC CCU GAC AA	Omisión a 300 nM
H11A(+134+157)	CCC UGA GGC AUU CCC AUC UUG AAU	Omisión a 100 nM
H11A(+20+45)	AUU ACC AAC CCG GCC CUG AUG GGC UG	Omisión hasta 25 nM

H11A(+46+75)	UCC AAU CAG CUU ACU UCC CAA UUG UAG AAU	Omisión fuerte a 25 nM, ligera señal a 2,5 nM
H11A(+50+75)	UCC AAU CAG CUU ACU UCC CAA UUG UA	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 2,5 nM
H11A(+50+79)	CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA	Omisión fuerte a 5 nM, débil a 2,5 nM
H11A(+80+105)	AGU UUC UUC AUC UUC UGA UAA UUU UC	Omisión débil hasta 25 nM
H11A(+106+135)	AUU UAG GAG AUU CAU CUG CUC UUG UAC UUC	Omisión fuerte hasta 25 nM (20%)
H11A(+110+135)	AUU UAG GAG AUU CAU CUG CUC UUG UA	Omisión fuerte hasta 25 nM (20%)
H11A(+110+139)	UUG AAU UUA GGA GAU UCA UCU GCU CUU GUA	Omisión fuerte hasta 25 nM (20%)

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 12

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 12 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 38.

Tabla 13: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 12

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H12D(+06-16)	CAU AAG AUA CAC CUA CCU UAU G	Sin omisión
H12A(+52+75)	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA	Omisión fuerte
H12A(+30+57)	CAG UCA UUC AAC UCU UUC AGU UUC UGA U	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 2,5 nM
H12A(+60+87)	UUC CUU GUU CUU UCU UCU GUU UUU GUU A	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 5 nM
H12A(+90+117)	AGA UCA GGU CCA AGA GGC UCU UCC UCC A	Omisión fuerte hasta 25 nM (30%)
H12A(+120+147)	UGU UGU UGU ACU UGG CGU UUU AGG UCU U	Omisión fuerte hasta 25 nM (30%)

10 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 13

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 13 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

- 15 Tabla 14: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 13

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H13A(-12+12)	UUC UUG AAG CAC CUG AAA GAU AAA	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 14

- 20 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 14 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 8.

Tabla 15: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 14

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H14A(+45 +73)	GAA GGA UGU CUU GUA AAA GAA CCC AGC GG	Omisión a 25 nM

25 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 16

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 16 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

- 30 Tabla 16: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 16

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H16A(-07+19)	CUA GAU CCG CUU UUA AAA CCU GUU AA	Sin omisión
H16A(+09+31)	GCU UUU UCU UUU CUA GAU CCG CU	Sin omisión
H16D(+18-07)	CAC UAA CCU GUG CUG UAC UCU UUU C	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 17

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 17 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 64: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 17

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H17A(+48+78)	UGU GGU CAC CGU AGU UAC UGU UUC CAU UCA A	Sin omisión
H17A(+55+85)	GUU CCC UUG UGG UCA CCG UAG UUA CUG UUU C	Omisión hasta 100 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 18

- 10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 18 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 9.

15 Tabla 17: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 18

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H18A(-09+11)	CAA CAU CCU UCC UAA GAC UG	Sin omisión
H18A(+24+43)	GCG AGU AAU CCA GCU GUG AA	Omisión inconsistente de ambos exones, 17+18
H18A(+41 +70)	UUC AGG ACU CUG CAA CAG AGC UUC UGA GCG	Omisión exones 17+18 300nM
H18A(+83+108)	UUG UCU GUG AAG UUG CCU UCC UUC CG	Omisión exones 17+18 300nM
H18D(+04-16)	UUA AUG CAU AAC CUA CAU UG	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 19

- 20 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 19 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 18: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 19

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H19A(+19+48)	GGC AUC UUG CAG UUU UCU GAA CUU CUC AGC	Omisión hasta 25 nM
H19A(+27+54)	UCU GCU GGC AUC UUG CAG UUU UCU GAA C	Omisión hasta 25 nM
H19D(+3-17)	UCA ACU CGU GUA AUU ACC GU	omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 20

- 25 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 20 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 19: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 20

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H20A(+23+47)	GUU CAG UUG UUC UGA GGC UUG UUU G	Sombra débil a 600 nM
H20A(+140+164)	AGU AGU UGU CAU CUG CUC CAA UUG U	Sin omisión

30 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 23

- Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 23 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Se

prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 23 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. H23(+69+98)-PNU contiene un polimorfismo de nucleótido único (PNU) que ha sido documentado anteriormente.

5 Tabla 65: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 23

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H23(+69+98)-PNU	CGG CUA AUU UCA GAG GGC GCU UUC UUU GAC	Omisión hasta 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 24

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 24 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 20: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 24

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H24A(+51 +73)	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC	Omisión fuerte a 25 nM

15 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 25

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 25 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. El oligonucleótido H25A(+95+119)-DupA es una molécula antisentido específica de paciente.

20 Tabla 21: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 25

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H25A(+10+34)	UGG GCU GAA UUG UCU GAA UAU CAC	Fuerte a 25 nM pero no redujo el producto de longitud completa.
H25D(+06-14)	GAG AUU GUC UAU ACC UGU UG	muy fuerte a 25 nM
H25A(+10+38)	AGA CUG GGC UGA AUU GUC UGA AUA UCA CU	Omisión fuerte a 5 nM, débil a 2,5 nM
H25A(+95+119)-DupA*	UUG AGU UCU GUU CUC AAG UCU CGA AG	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 5 nM (específico de paciente)
H25D(+13-14)	GAG AUU GUC UAU ACC UGU UGG CAC AUG	Omisión fuerte a 10 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 26

25 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 26 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 10.

Tabla 22: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 26

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H26A(-16+09)	GGC AUA GAC CUU CCA CAA AAC AAA C	Omisión débil a 600 nM y 300 nM
H26A(-7+23)	AAG GCC UCC UUU CUG GCA UAG ACC UUC CAC	Débil a 600, 300 nM; exones múltiples 26 a 29 o 27 a 30
H26A(-03+27)	CUU CAA GGC CUC CUU UCU GGC AUA GAC CUU	Débil a 600, 300 nM; exones múltiples 26 a 29 o 27 a 30
H26A(+5+35)	AAC CUC CCU UCA AGG CCU CCU UUC UGG CAU	Sin omisión
H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC	Débil a 600, 300 nM; exones múltiples 26 a 29 o 27 a 30
H26D(+06-19)	UUU CUU UUU UUU UUU UUA CCU UCA U	Débil a 600 nM; exones múltiples 26 a 29 o 27 a 30
H26D(+21-04)	UUA CCU UCA UCU CUU CAA CUG CUU U	Exones múltiples 26 a 29 o 27 a 30
H26D(+10-10)	UUU UUU UUA CCU UCA UCU CU	Sin omisión 26 otras bandas
Cócteles de exón 26		

H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC	Omisión fuerte bajando hasta 25 nM
H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC	
H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G	

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 31

5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 31 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 23: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 31

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H31D(+12-18)	UUC UGA AAU UUC AUA UAC CUG UGC AAC AUC	Omisión hasta 100 nM
H31D(+08-22)	UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CCU GUG CAA	Omisión hasta 100 nM
H31D(+06-24)	CUU AGU UUC UGA AAU AAC AUA UAC CUG UGC	Omisión hasta 100 nM
H31 D(+02-22)	UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CCU	Omisión hasta 100 nM
H31D(+01-25)	CCU UAG UUU CUG AAA UAA CAU AUA CC	Omisión fuerte a 300 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 32

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 32 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 24: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 32

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H32A(+49+78)	ACU UUC UUG UAG ACG CUG CUC AAA AUU GGC	Omisión hasta 100 nM

15 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 34

20 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 34 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 25: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 34

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H34A(+36+59)	UUU CGC AUC UUA CGG GAC AAU UUC	Omisión hasta 200 nM
H34A(+41+70)	CAU UCA UUU CCU UUC GCA UCU UAC GGG ACA	Omisión hasta 200 nM
H34A(+43+72)	GAC AUU CAU UUC CUU UCG CAU CUU ACG GGA	Omisión hasta 100 nM
H34A(+51+83)	UCU GUC AAG ACA UUC AUU UCC UUU CGC AUC	Omisión hasta 200 nM
H34A(+91+120)	UGA UCU CUU UGU CAA UUC CAU AUC UGU AGC	Omisión hasta 100 nM
H34A(+92+121)	CUG AUC UCU UUG UCA AUU CCA UAU CUG UGG	Omisión hasta 100 nM
H34A(+95+120)	UGA UCU CUU UGU CAA UUC CAU AUC UG	Débil hasta 25 nM
H34A(+95+124)	CUG CUG AUC UCU UUG UCA AUU CCA UAU CUG	Omisión hasta 100 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 35

25 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 35 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 26: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 35

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
--	-----------	------------------------------

H35A(+14+43)	UCU UCA GGU GCA CCU UCU GUU UCU CAA UCU	Omisión hasta 100 nM
H35A(+24+53)	UCU GUG AUA CUC UUC AGG UGC ACC UUC UGU	Omisión hasta 100 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 36

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 36 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 11.

Tabla 27: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 36

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A	Sin omisión
H36A(-01+19)	CCA UGU GUU UCU GGU AUU CC	Omisión muy débil a 300 nM
H36A(+10+39)	CAC AUU CUG GUC AAA AGU UUC CAU GUG UUU	Omisión hasta 25 nM
H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU	Omisión a 100 nM
H36A(+27+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC A	Omisión a 100 nM
H36A(+27+56)	CAC UUU GUG AUG UGG UCC ACA UUC UGG UCA	Omisión a 300 nM
H36A(+32+61)	UGA UCC ACU UUG UGA UGU GGU CCA CAU UCU	Omisión hasta 25 nM
H36A(+59+78)	AAG UGU GUC AGC CUG AAU GA	Omisión muy débil
H36A(+65+94)	UCU CUG AUU CAU CCA AAA GUG UGU CAG CCU	100% omisión a 600 nM, omisión hasta 25 nM
H36A(+80+109)	GCU GGG GUU UCU UUU UCU CUG AUU CAU CCA	100% omisión a 600 nM, omisión hasta 25 nM
H36D(+15-10)	UAU UUG CUA CCU UAA GCA CGU CUU C	Omisión muy débil
Códices de exón 36		
H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A	
H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU	Buen nivel de omisión bajando hasta 25 nM

10 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 38

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 38 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

15 Tabla 28: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 38

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H38A(-21-01)	CUA AAA AAA AAG AUA GUG CUA	Omisión hasta 25 nM
H38A(-12+14)	AAA GGA AUG GAG GCC UAA AAA AAA AG	Omisión hasta 25 nM
H38D(+14-11)	AAC CAA UUU ACC AUA UCU UUA UUG A	Omisión hasta 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 39

- 20 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 39 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 29: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 39

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H39A(-07+23)	ACA GUA CCA UCA UUG UCU UCA UUC UGA UC	Omisión hasta 600 nM
H39A(-07+23)	ACA GUA CCC UCA UUG UCU UCA UUC UGA UC	Omisión hasta 600 nM
H39A(+58+87)	CUC UCG CUU UCU CUC AUC UGU GAU UCU UUG	Omisión hasta 100 nM

H39A(+60+89)	UCC UCU CGC UUU CUC UCA UCU GUG AUU CUU	Omisión hasta 100 nM
H39A(+102+126)	UAU GUU UUG UCU GUA ACA GCU GCU G	Omisión hasta 600 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 41

5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 41 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 30: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 41

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
H41A(-15+5)	AUU UCC UAU UGA GCA AAA CC	Omisión bajando hasta 200 nM
H41A(+66+90)	CAU UGC GGC CCC AUC CUC AGA CAA G	Omisión bajando hasta 100 nM
H41A(+92+120)	GCU GAG CUG GAU CUG AGU UGG CUC CAC UG	Omisión bajando hasta 10 nM
H41A(+143+171)	GUU GAG UCU UCG AAA CUG AGC AAA UUU GC	Sin omisión visible
H41 D(+5-15)	CCA GUA ACA ACU CAC AAU UU	Omisión bajando hasta 200 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 42

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 42 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 31: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 20

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 42		
H42D(+18-02)	ACC UUC AGA GAC UCC UCU UGC	Omisión fuerte

15

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 43

20 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 43 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 12.

Tabla 32: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 20

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 43		
H43A(+83+110)	UCC UGU AGC UUC ACC CUU UCC ACA GGC G	Sin omisión
H43A(+92 +117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	Omisión a 10 nM
H43A(+101 +130)	AAU CA GCU GGG AGA GAG CUU CCU GUA GCU	Sin omisión
H43D(+08-12)	UGU GUU ACC UAC CCU UGU CG	Omisión bajando hasta 200 nM
H43A(-09+18)	UAG ACU AUC UUU UAU AUU CUG UAA UAU	Omisión débil hasta 25 nM
H43A(+89+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UUC CA	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 2,5 nM
H43A(+81+111)	UUC CUG UAG CUU CAC CCU UUC CAC AGG CGU U	Omisión fuerte a 50 nM, débil a 2,5 nM
H43A(+92+114)	AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	Omisión débil hasta 2,5 nM
H43A(+92+120)	GGA GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 5 nM
H43A(+95+117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CC	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 10 nM

25

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 44

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 44 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Ver las figuras 13 y 39.

5 Tabla 33: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 44

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 44		
H44A(-13+13)	UCU GUC AAA UCG CCU GCA GGU AAA AG	
H44A(-06+24)	UUC UCA ACA GAU CUG UCA AAU CGC CUG CAG	Sin omisión
H44A(+44+68)	GCC ACU GAU UAA AUA UCU UUA UAU C	Omisión a 100 nM
H44A(+46+75)	UCU GUU AGC CAC UGA UUA AAU AUC UUU AUA	Omisión a 50 nM
H44A(+61 +84)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA	Omisión a 100 nM
H44A(+61+91)	GAG AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG A	Omisión a 25 nM
H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA	Omisión a 10 nM
H44A(+68+98)	UCU UUC UGA GAAACU GUU CAG CUU CUG UUA G	Débil a 50 nM
H44A(-09+17)	CAG AUC UGU CAA AUC GCC UGC AGG UA	Omisión débil hasta 10 nM
H44A(-06+20)	CAA CAG AUC UGU CAA AUC GCC UGC AG	Omisión débil hasta 2,5 nM
H44A(+56+88)	AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU AAA _ _ _ _ _	Omisión fuerte a 5 nM, débil a 2,5 nM
H44A(+59+85)	CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU	Omisión fuerte a 5 nM
H44A(+59+89)	GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA GCC ACU GAU U	Omisión débil hasta 10 nM
H44A(+61+88)	AAA CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG A	Omisión débil hasta 25 nM
H44A(+65+92)	UGA GAAACU GUU CAG CUU CUG UUA GCC A	Omisión débil hasta 25 nM
H44A(+64+95)	UUC UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UUA GCCA G _ _ _ _	Omisión débil hasta 25 nM
H44A(+70+95)	UUC UGA GAA ACU GUU CAG CUU CUG UU	Omisión débil hasta 50 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 45

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 45 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Ver las figuras 14 y 40.

Tabla 34: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 45

ES 2 693 459 T3

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 45		
H45A(-14+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	Genera múltiples bandas
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	Omisión a 10 nM
H45A(-09+30)	UUG CCG CUG CCC AAU GCC AUC CUG GAG UUC CUG UAA GAU	Sin omisión
H45A (-09+2b)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	Omisión a 10 nM (omisión de 100% a 25 nM)
H45A(-08 +19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA	Omisión a 50 nM
HM45A(-07+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	Omisión a 25 nM
H45A(+09 +34)	CAG UUU GCC GCU GCC CAA UGC CAU CC	Sin omisión
H45A(+41 +64)	CUU CCC CAG UUG CAU UCA AUG UUC	Sin omisión
H45A(+76 +98)	CUG GCA UCU GUU UUU GAG GAU UG	Sin omisión
H45D(+02-18)	UUA GAU CUG UCG CCC UAC CU	Sin omisión
H45A(-14+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC CAA	
H45A(-12+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	Omisión fuerte a 5 nM, débil a 2,5 nM
H45A(-12+13)	CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	Sin omisión
H45A(-12+16)	UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 5 nM
H45A(-09+16)	UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	Omisión hasta 10 nM
H45A(-09+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 2,5 nM
H45A(-09+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 5 nM
H45A(-09+30)	UUG CCG CUG CCC AAU GCC AUC CUG GAG UUC CUG UAA GAU	Omisión fuerte a 5 nM, débil a 2,5 nM
HM45A(-07+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AG	Omisión fuerte a 2,5 nM
H45A(-06+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	Omisión fuerte a 5 nM, débil a 2,5 nM
H45A(-06+28)	GCC GCU GCC CAA UGA CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	Omisión fuerte a 2,5 nM
H45A(-03+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	Omisión fuerte a 5 nM, débil a 2,5 nM
H45A(-03+22)	GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 2,5 nM
H45A(-03+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	Omisión fuerte a 2,5 nM
H45A(-03+28)	GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 2,5 nM
H45D(+10-19)	AUU AGA UCU GUC GCC CUA CCU CUU UUU UC	Sin omisión
H45D(+16-11)	UGU CGC CCU ACC UCU UUU UUC UGU CUG	Sin omisión
H45A(-06+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A	Omisión fuerte a 2,5 nM
H45A(-12+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C	Omisión fuerte a 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 46

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 46 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Ver las figuras 15 y 44.

5

Tabla 35: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 46

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 46		
H46A(-05+19)	AUU CUU UUG UUC UUC UAG CCU GGA	Sin omisión
H46A(+16+42)	UCU CUU UGA AAU UCU GAC AAG AUA UUC	Omisión hasta 25 nM, otras bandas
H46A(+27+44)	UUA AAU CUC UUU GAA AUU CU	Sin omisión
H46A(+35+60)	AAA ACA AAU UCA UUU AAA UCU CUU UG	Omisión muy débil hasta 50 nM
H46A(+56+77)	CUG CUU CCU CCA ACC AUA AAA C	Sin omisión
H46A(+63+87)	GCA AUG UUA UCU GCU UCC UCC AAC C	Sin omisión
H46A(+81+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU	Omisión fuerte a 25 nM
H46A(+83+103)	UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU	Omisión a 25 nM
H46A(+90+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU AC	Sin omisión
H46A(+91+118)	CUG CUC UUU UCC AGG UUC AAG UGG GAU A	Omisión fuerte a 25 nM
H46A(+95+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG G	Omisión fuerte a 25 nM
H46A(+101+128)	CUU UUA GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU C	Omisión fuerte a 25 nM
H46A(+113+136)	AAG CUU UUC UUU UAG UUG CUG CUC	Omisión a 100 nM
H46A(+115+134)	GCU UUU CUU UUA GUU GCU GC	Omisión a 100 nM
H46A(+116+145)	GAC UUG CUC AAG CUU UUC UUU UAG UUG CUG	Omisión fuerte a 25 nM
H46D(+02-18)	UUC AGA AAA UAA AAU UAC CU	Sin omisión
H46A(+93+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA	100% de omisión a 25 nM, fuerte a 5 nM
H46A(+95+124)	UAG UUG CUG CUC UUU UCC AGG UUC AAG UGG	100% de omisión a 25 nM

Cócteles de oligonucleótidos antisentido dirigidos a los exones 44 a 46

10

Se prepararon cócteles de oligonucleótidos antisentido dirigidos a los exones 44 a 46 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

15

Tabla 36: cócteles de secuencias de molécula antisentido que inducen la omisión de los exones 44 a 45

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Cócteles para la omisión de 44 + 45		
H44A(+65 +90)	AGA AAC UGU UCA GCU UCU GUU AGC CA	
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	Omisión a 25 nM
Cócteles para la omisión de los exones 45 y 46		
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	
H46A(+91 +118)	CUG CUC UUU UCC AGG UUC AGG UGG GAU A	Omisión a 25 nM
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	
H46A(+107 +137)	CAA GCU UUU CUU UUA GUU GCU GCU CUU UUC C	Omisión a 25 nM
Cóctel para la omisión de los exones 44/45/46		
H45A(-10 +20)	CCA AUG CCA UCC UGG AGU UCC UGU AAG AUA	

H44A(+65 +90)	AGA AAC UGU UCA GCU UCU GUU AGC CA	
H46A(+91 +118)	CUG CUC UUU UCC AGG UUC AGG UGG GAU A	Omisión a 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 47

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 47 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 16.

5

Tabla 37: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 47

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 47		
H47A(-07+19)	GCA ACU CUU CCA CCA GUA ACU GAA AC	Omisión a 100 nM
H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA	Omisión fuerte a 25 nM
H47A(+44+70)	GCA CGG GUC CUC CAG UUU CAU UUA AUU	Omisión a 600 nM
H47A(+68+92)	GGG CUU AUG GGA GCA CUU ACA AGC A	Sin omisión
H47A(+73+103)	CUU GCU CUU CUG GGC UUA UGG GAG CAC UUA C	Sin omisión
H47A(+76+103)	CUU GCU CUU CUG GGC UUA UGG GAG CAC U	Omisión débil a 200 nM, no se reduce la cantidad de producto de longitud completa
H47D(+17-10)	AAU GUC UAA CCU UUA UCC ACU GGA GAU	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 48

10

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 48 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 17.

15 Tabla 38: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 48

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 48		
H48A(-09+21)	CUC AGG UAA AGC UCU GGA AAC CUG AAA GGA	Sin omisión
H48A(-08+19)	CAG GUA AAG CUC UGG AAA CCU GAA AGG	Sin omisión
H48A(-07+23)	UUC UCA GGU AAA GCU CUG GAA ACC UGA AAG	Omisión a 600, 300 nM
H48A(-05+25)	GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA CCU GAA	Sin omisión
H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C	Débil hasta 50 nM
H48A(+07+33)	UUC UCC UUG UUU CUC AGG UAA AGC UCU	Débil hasta 50 nM
H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C	Sin emisión (esporádica)
H48A(+75+100)	UUA ACU GCU CUU CAA GGU CUU CAA GC	Débil hasta 1.000 nM
H48A(+96+122)	GAU AAC CAC AGC AGC AGA UGA UUU AAC	Sin omisión
H48D(+17-10)	AGU UCC CUA CCU GAA CGU CAA AUG GUC	Sin omisión
H48D(+16-09)	GUU CCC UAC CUG AAC GUC AAA UGG U	Sin omisión
Cóctel 48		
H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C	Omisión fuerte a 25 nM
H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C	

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 49

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 49 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 18.

20

Tabla 39: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 49

25

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 49		
H49A(-07+19)	GAA CUG CUA UUU CAG UUU CCU GGG GA	Omisión hasta 100 nM
H49A(+22+47)	AUC UCU UCC ACA UCC GGU UGU UUA GC	Omisión hasta 25 nM
H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GCC CUU UAG ACA AAA UC	Omisión hasta 25 nM
H49D(+18-08)	UUC AUU ACC UUC ACU GGC UGA GUG GC	Omisión hasta 100 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 50

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 50 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Ver las figuras 19 y 33

Tabla 40: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 50

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 50		
H50A(-07+20)	CUC AGA UCU UCU AAC UUC CUC UUU AAC	Omisión débil a 25 nM
H50A(-02+27)	CUC AGA GCU CAG AUC UUC UAA CUU CCU CU	Omisión débil a 100 nM
H50A(+10+36)	CGC CUU CCA CUC AGA GCU CAG AUC UUC	Omisión débil hasta 25
H50A(+35+61)	UCA GCU CUU GAA GUA AAC GGU UUA CCG	Omisión fuerte hasta 25 nM
H50A(+42+68)	UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU AAA CGG	Omisión razonable hasta 25 nM
H50A(+48+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU	Omisión fuerte a 25 nM
H50A(+63+88)	CAG GAG CUA GGU CAG GCU GCU UUG CC	Omisión fuerte hasta 25 nM
H50A(+81+105)	UCC AAU AGU GGU CAG UCC AGG AGC U	
H50D(-01-27)	AAA GAG AAU GGG AUC CAG UAU ACU UAC	Omisión débil a 100 nM
H50D(-15-41)	AAA UAG CUA GAG CCA AAG AGA AUG GGA	Sin omisión
H50A(+42+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU AAA CGG	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 5 nM
H50A(+46+75)	AGG CUG CUU UGC CCU CAG CUC UUG AAG UAA	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 10 nM
H50A(+48+78)	GUC AGG CUG CUU UGC CCU CAG CUC UUG AAG U	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 2,5 nM
H50A(+51 +80)	AGG UCA GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 2,5 nM
Hint49(-72-46)	AAG AUA AUU CAU GAA CAU CUU AAU CCA	Sin omisión

10

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 51

- 15 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 51 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Ver las figuras 20 y 41.

Tabla 41: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 51

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 51		
H51A(-29-10)	UUU GGG UUU UUG CAA AAA GG	Sin omisión
H51A(-22-01)	CUA AAA UAU UUU GGG UUU UUG C	Sin omisión
H51A(-14+10)	UGA GUA GGA GCU AAA AUA UUU UGG	Sin omisión
H51(+26+52)	GUU UCC UUA GUA ACC ACA GGU UGU GUC	Omisión muy débil hasta 25 nM
H51A(+40+67)	AGU UUG GAG AUG GCA GUU UCC UUA GUA A	Omisión hasta 25 nM, también omite 50 o 52
H51A(+66+77)	UGG CAU UUC UAG	Sin omisión
H51A(+66+80)	AGA UGG CAU UUC UAG	Sin omisión
H51A(+66+83)	GGA AGA UGG CAU UUC UAG	Sin omisión

H51A(+78+95)	CUC CAA CAU CAA GGA AGA	Sin omisión
H51A(+81+95)	CUC CAA CAU CAA GGA	Sin omisión
H51A(+84+95)	CUC CAA CAU CAA	Sin omisión
H51A(+90+116)	GAA AUC UGC CAG AGC AGG UAC CUC CAA	Sin omisión
H51A(+53+79)	GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AUG GCA	Omisión fuerte a 25 nM
H51A(+57+85)	AAG GAA GAU GGC AUU UCU AGU UUG GAG AU	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 2,5 nM
H51A(+71+100)	GGU ACC UCC AAC AUC AAG GAA GAU GGC AUU	Omisión fuerte a 5 nM
H51A(+76+104)	AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG	Omisión fuerte a 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 52

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 52 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 42.

Tabla 42: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 52

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 52		
H52A(-12+13)	CCU GCA UUG UUG CCU GUA AGA ACA A	Sin omisión
H52A(-10+10)	GCA UUG UUG CCU GUA AGA AC	Sin omisión
H52A(+07+33)	GGG ACG CCU CUG UUC CAA AUC CUG CAU	Omisión a 50 nM
H52A(+17+46)	GUU CUU CCA ACU GGG GAC GCC UCU GUU CCA	Omisión a 25 nM
H52A(+17+37)	ACU GGG GAC GCC UCU GUU CCA	Omisión a 25 nM
H52A(+67+94)	CCU CUU GAU UGC UGG UCU UGU UUU UCA A	Omisión extremadamente débil a 25 nM
Hint51(-40-14)	UAC CCC UUA GUA UCA GGG UUC UUC AGC	Sin omisión (PNU C o T)
H52A(+09+38)	AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC	Omisión fuerte a 2,5 nM
H52A(+09+41)	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC	Omisión fuerte hasta 5 nM, débil a 5 nM
H52A(+15+44)	UCU UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA	Omisión fuerte hasta 10 nM, débil a 5 nM

10 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 53

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 53 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 43.

15 Tabla 43: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 53

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 53		
H53A(-49-26)	AUA GUA GUA AAU GCU AGU CUG GAG	Sin omisión
H53A(-38-13)	GAA AAA UAA AUA UAU AGU AGU AAA UG	Sin omisión
H53A(-32-06)	AUA AAA GGA AAA AUA AAU AUA UAG UAG	Sin omisión
H53A(-15+15)	UCU GAA UUC UUU CAA CUA GAA UAA AAG GAA	Sin omisión
H53A(+39+65)	CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG	Omisión a 50 nM
H53A(+39+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UG	Omisión a 100 nM
H39A(+39+69)-PNU	CGU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU G	Omisión hasta 25 nM
H53A(+40+70)	UCA UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG U	Omisión a 50 nM
H53A(+41+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GG	Omisión a 50 nM
H53A(+43+69)	CAU UCA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA	Omisión a 50 nM
H53A(+69+98)	CAG CCA UUG UGU UGA AUC CUU UAA CAU UUC	Omisión a 50 nM
Hint52(-47-23)	UAU AUA GUA GUA AAU GCU AGU CUG G	Sin omisión
H53A(+27+56)	CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC UUC	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 5 nM

H53A(+27+59)	UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC UUC	Omisión fuerte a 10 nM, débil a 5 nM
H53A(+30+59)	UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG UAC	
H53A(+30+64)	AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU UGU AC	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 10 nM
H53A(+30+69)	CAU UGA ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU GUU CUU GUA C	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 5 nM
H53A(+33+63)	ACU GUU GCC UCC GGU UCU GAA GGU GUU CUU G	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 5 nM
H53A(+33+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU UG	Omisión fuerte a 50 nM, débil a 5 nM
H53A(+33+65)	CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG UUC UUG	Omisión fuerte a 25 nM, débil a 2,5 nM
H53A(+35+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU	Omisión fuerte hasta 25 nM
H53A(+37+67)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU U	Omisión fuerte hasta 25 nM
H53A(+36+70)	UCA UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UC	Omisión razonable hasta 5 nM
H53A(+39+71)	UUC AUU CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG GUG	Omisión fuerte hasta 25 nM
H53A(+42+71)	UUC AUU CAA CUG UUG CCU CCG GUU CUG AAG	Omisión fuerte a 100 nM, débil a 5 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 54

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 54 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 21.

Tabla 44: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 54

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 54		
H54A(+13+34)	UUG UCU GCC ACU GGC GGA GGU C	Omisión a 300 nM, produce 55+54
H54A(+60+90)	AUC UGC AGA AUA AUC CCG GAG AAG UUU CAG	Omisión a 25 nM
H54A(+67+89)	UCU GCA GAA UAA UCC CGG AGA AG	Omisión débil hasta 40 nM - ambos, 54+55
H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G	Omisión a 10 nM
H54A(+77+106)	GGA CUU UUC UGG UAU CAU CUG CAG AAU AAU	Omisión a 50 nM
Cóctel para los exones 54+55		
H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G	Específico para la omisión de 54 y 55 a 10 nM
H55A(-10+14)	CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	Sin bandas adicionales

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 55

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 55 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 22.

5

Tabla 45: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 55

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 55		
H55A(-10+14)	CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	Sin omisión
H55A(-10 +20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA	Omisión a 10 nM
H55A(+39 +61)	CAG GGG GAA CUG UUG CAG UAA UC	Sin omisión
H55A(+41+71)	UCU UUU ACU CCC UUG GAG UCU UCU AGG AGC C	Sin omisión
H55A(+73+93)	UCU GUA AGC CAG GCA AGA AAC	Sin omisión
H55A(+107+137)	CCU UAC GGG UAG CAU CCU GAU GGA CAU UGG C	Sin omisión
H55A(+112+136)	CUU ACG GGU AGC AUC CUG UAG GAC A	Omisión muy débil a 100 nM
H55A(+132+161)	CCU UGG AGU CUU CUA GGA GCC UUU CCU UAC	Omisión a 200 nM
H55A(+141+160)	CUU GGA GUC UUC UAG GAG CC	Omisión a 100 nM
H55A(+143 +171)	CUC UUU UAC UCC CUU GGA GUC UUC UAG GAG	Sin omisión
H55D(+11-09)	CCU GAC UUA CUU GCC AUU GU	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 56

10

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 56 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 23.

15 Tabla 46: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 56

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 56		
H56A(-06+23)	GCU UCA AUU UCA CCU UGG AGG UCC UAC AG	Omisión a 25 nM
H56A(-06+15)	UUC ACC UUG GAG GUC CUA CAG	Sin omisión
H56A(+23+44)	GUU GUG AUA AAC AUC UGU GUG A	Sin omisión
H56A(+56 +81)	CCA GGG AUC UCA GGA UUU UUU GGC UG	Sin omisión
H56A(+67+91)	CGG AAC CUU CCA GGG AUC UCA GGA U	Omisión a 200 nM
H56A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU	Omisión a 25 nM
H56A(+102+126)	GUU AUC CAA ACG UCU UUG UAA CAG G	Omisión a 100 nM
H56A(+102+131)	UUC AUG UUA UCC AAA CGU CUU UGU AAC AGG	Omisión a 25 nM
H56A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU	Omisión a 25 nM
H56A(+117+146)	UCA CUC CAC UUG AAG UUC AUG UUA UCC AAA	Omisión débil a 25 nM
H56A(+121+143)	CUC CAC UUG AAG UUC AUG UUA UC	Sin omisión
H56D(+11-10)	CUU UUC CUA CCA AAU GUU GAG	Omisión a 600 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 57

20

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 57 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 24.

Tabla 47: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 57

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 57		
H57A(-15+18)	CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA AAG AAC AGC	Sin omisión
H57A(-12+18)	CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA AAG AAC	Omisión a 50 nM
H57A(-10+20)	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA	Omisión a 300 nM

H57A(-06 +24)	UCA GAA CUG GCU UCC AAA UGG GAC CUG AAA	Omisión a 300 nM
H57A(+21+44)	GGU GCA GAC GCU UCC ACU GGU CAG	Sin omisión
H57A(+47 +77)	GCU GUA GCC ACA CCA GAA GUU CCU GCA GAG A	Sin omisión
H57A(+79+103)	CUG CCG GCU UAA UUC AUC AUC UUU C	Sin omisión
H57A(+105+131)	CUG CUG GAA AGU CGC CUC CAA UAG GUG	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 59

5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 59 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 25.

Tabla 48: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 59

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 59		
H59A(-06+16)	UCC UCA GGA GGC AGC UCU AAA U	Sin omisión
H59A(+31 +61)	UCC UC GCC UGC UUU CGU AGA AGC CGA GUG A	Sin omisión
H59A(+66+91)	AGG UUC AAU UUU UCC CAC UCA GUA UU	Sin omisión
H59A(+96 +120)	CUA UUU UUC.UCU GCC AGU CAG CGG A	Omisión a 100 nM
H59A(+96+125)	CUC AUC UAU UUU UCU CUG CCA GUC AGC GGA	Sin omisión
H59A(+101 +132)	CA GGG UCU CAU CUA UUU UUC UCU GCC AGU CA	Sin omisión
H59A(+141 +165)	CAU CCG UGG CCU CUU GAA GUU CCU G	Omisión exones 58 y 59 a 200nM
H59A(+151+175)	AGG UCC AGC UCA UCC GUG GCC UCU U	Omisión a 300 nM
H59A(+161 +185)	GCG CAG CUU GAG GUC CAG CUC AUC C	Omisión débil a 200 nM
H59A(+161+190)	GCU UGG CGC AGC UUG AGG UCC AGC UCA UCC	Omisión a 100 nM
H59A(+171+197)	CAC CUC AGC UUG GCG CAG CUU GAG GUC	Sin omisión
H59A(+181+205)	CCC UUG AUC ACC UCA GCU UGG CGC A	Sin omisión
H59A(+200+220)	ACG GGC UGC CAG GAU CCC UUG	Sin omisión
H59A(+221+245)	GAG AGA GUC AAU GAG GAG AUC GCC C	Sin omisión
H59A(+92+125)	CUC AUC UAU UUU UCU CUG CCA GUC AGC GGA GUG C	

10 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 60

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 60 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 26.

15 Tabla 49: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 60

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 60		
H60A(-10+20)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	Sin omisión
H60A-8+19	CAA UUU CUC CUC GAA GUG CCU GUG UGC	Sin omisión
H60A(+29+58)	CAA GGU CAU UGA CGU GGC UCA CGU UCU CUU	Omisión hasta 50 nM
H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC	Omisión fuerte hasta 50 nM
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	buen nivel de omisión a 100 nM
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC AUU GAC GUG GCU CAC	PSN
H60A(+39+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU C	buen nivel de omisión a 100 nM
H60A(+43+73)	UGG UAA GCU GGC GAG CAA GGU CCU UGA CGU G	Omisión débil a 100 nM
H60A(+51+75)	AGU GGU AAG CUG GCG UGC AAG GUC A	Omisión débil a 100 nM
H60A(+72+102)	UUA UAC GGU GAG AGC UGA AUG CCC AAA GUG	Sin omisión
H60A(+75+105)	GAG GUU AUA CGG UGA GAG CUG AAU GCC CAA A	Sin omisión

H60A(+80+109)	UGC UGA GGU UAU ACG GUG AGA GCU GAA	buen nivel de omisión a 100 nM
H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC	Omisión débil a 100 nM
H60D(+25-5)	CUU UCC UGC AGA AGC UUC CAU CUG GUG UUC	Omisión débil a 600 nM
Cócteles de exón 60		
H60A(-8+19)	CAA UUU CUC CUC GAA GUG CCU GUG UGC	
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	Omisión débil a 10 nM
H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC	
H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC	Omisión a 10 nM
H60A(-10+20)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	
H60A(+43+73)	UGG UAA GCU GGC GAG CAA GGU CCU UGA CGU G	Omisión a 10 nM
H60A(+39+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU C	
H60A(-10+20)	GCA AUU UCU CCU CGA AGU GCC UGU GUG CAA	Omisión a 10 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 61

- 5 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 61 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 50: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 61

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 61		
H61A(-7+19)	CUC GGU CCU CGA CGG CCA CCU GGG AG	Sin omisión
H61A(+05+34)	CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU CGC CGG	Omisión hasta 50 nM
H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C	Omisión a 100 nM
H61A(+16+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC G	Sin omisión
H61A(+16+45)	CCU GUG GGC UUC AUG CAG CUG CCU GAC UCG	Omisión hasta 50 nM
H61A(+42+67)	GCU GAG AUG CUG GAC CAA AGU CCC UG	Sin omisión
H61D(+10-16)	GCU GAA AAU GAC UUA CUG GAA AGA AA	Sin omisión

10

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 62

- Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 62 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 51: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 62

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 62		
H62A(-15+15)	GAC CCU GGA CAG ACG CUG AAA AGA AGG GAG	Sin omisión
H62A(-10+20)	CCA GGG ACC CUG GAC AGA CGC UGA AAA GAA	Sin omisión
H62A(-05+15)	GAC CCU GGA CAG ACG CUG AA	Débil hasta 25 nM
H62A(-3+25)	CUC UCC CAG GGA CCC UGG ACA GAC GCU G	Sin omisión
H62A(+01+30)	UGG CUC UCU CCC AGG GAC CCU GGA CAG ACG	Omisión de prácticamente 100% hasta 300 nM
H62A(+8+34)	GAG AUG GCU CUC UCC CAG GGA CCC UGG	Omisión a 300 nM
H62A(+13+43)	UUG UUU GGU GAG AUG GCU CUC UCC CAG GGA C	Débil hasta 25 nM
H62A(+23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC	Omisión a 100 nM
H62D(+17-03)	UAC UUG AUA UAG UAG GGC AC	Débil hasta 100 nM
H62D(+25-5)	CUU ACU UGA UAU AGU AGG GCA CUU UGU UUG	Sin omisión

15

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 63

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 63 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 27.

5

Tabla 52: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 63

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 63		
H63A(-14+11)	GAG UCU CGU GGC UAA AAC ACA AAA C	Sin omisión visible
H63A(+11+35)	UGG GAU GGU CCC AGC AAG UUG UUU G	Posible omisión a 600 nM
H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA	Omisión hasta 100 nM
H63A(+33+57)	GAC UGG UAG AGC UCU GUC AUU UUG G	Sin omisión visible
H63A(+40+62)	CUA AAG ACU GGU AGA GCU CUG UC	Sin omisión
H63D(+8-17)	CAU GGC CAU GUC CUU ACC UAA AGA C	Sin omisión visible

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 64

10

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 64 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 28.

15 Tabla 53: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 64

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 64		
H64A(-3+27)	CUG AGA AUC UGA CAU UAU UCA GGU CAG CUG	Sin omisión
H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC AGU CC	Omisión a 50 nM
H64A(+43+72)	AAA GGG CCU UCU GCA GUC UUC GGA GUU UCA	Omisión a 50 nM
H64A(+47+74)	GCA AAG GGC CUU CUG CAG UCU UCG GAG	Omisión a 200 nM
H64D(+15-10)	CAA UAC UUA CAG CAA AGG GCC UUC U	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 65

20

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 65 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 54: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 65

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 65		
H65A(+123+148)	UUG ACC AAA UUG UUG UGC UCU UGC UC	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 66

25

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 66 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 29.

30 Tabla 55: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 66

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 66		
H66A(-8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG	Omisión a 100 nM
H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU	Sin omisión
H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC	Sin omisión
Cócteles de exón 66		
H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU	Omisión a 25 nM
H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC	

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 67

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 67 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 30.

5 Tabla 56: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 67

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 67		
H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC	Omisión fuerte a 25 nM
H67A(+120+147)	AGC UCC GGA CAC UUG GCU CAA UGU UAC U	Sin omisión
H67A(+125+149)	GCA GCU CCG GAC ACU UGG GUC AAU G	Omisión a 600 nM
H67D(+22-08)	UAA CUU ACA AAU UGG AAG CAG CUC CGG ACA	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 68

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 68 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Véase la figura 31.

Tabla 57: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 68

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 68		
H68A(-4+21)	GAU CUC UGG CUU AUU AUU AGC CUG C	Omisión a 100 nM
H68A(+22+48)	CAU CCA GUC UAG GAA GAG GGC CGC UUC	Omisión a 200 nM
H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C	Omisión a 200 nM
H68A(+74+103)	CAG CAG CCA CUC UGU GCA GGA CGG GCA GCC	Sin omisión
H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC	Sin omisión
Cócteles de exón 68		
H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C	Omisión a 10 nM
H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC	

15 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 69

20 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 69 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente. Ver la figura 32 que muestra un cóctel de H69A(+32+60) y H70A(-06+18) para eliminar ambos exones, 69 y 70.

Tabla 58: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 69

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 69		
H69A(-12+19)	GUG CUU UAG ACU CCU GUA CCU GAU AAA GAG C	Sin omisión
H69A(+09 +39)	UGG CAG AUG UCA UAA UUA AAG UGC UUU AGAC	Omisión de 68 a 71 a 200 nM
H69A(+29 +57)	CCA GAA AAA AAG CAG CUU UGG CAG AUG UC	Omisión de 68 a 71 a 200 nM, también 68+69 y 69+70
H69A(+51+74)	GGC CUU UUG CAA CUC GAC CAG AAA	Omisión de 68 a 71
H69A(+51 +80)	UUU UAU GGC CUU UUG CAA CUC GAC CAG AAA	omisión de ~90% de 68 a 71 a 200nM
H69D(+08-16)	CUG GCG UCA AAC UUA CCG GAG UGC	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 70

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 70 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

5 Tabla 59: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 70

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 70		
H70A(-09+15)	UUC UCC UGA UGU AGU CUA AAA GGG	Sin omisión
H70A(-07 +23)	CGA ACA UCU UCU CCU GAU GUA GUC UAA AAG	Sin omisión
H70A(+16 +40)	GUA CCU UGG CAA AGU CUC GAA CAU C	Sin omisión
H70A(+25 +48)	GUU UUU UAG UAC CUU GGC AAA GUC	Sin omisión
H70A(+32+60)	GGU UCG AAA UUU GUU UUU UAG UAC CUU GG	Sin omisión
H70A(+64 +93)	GCC CAU UCG GGG AUG CUU CGC AAA AUA CCU	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 71

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 71 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 60: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 71

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 71		
H71A(-08+16)	GAU CAG AGU AAC GGG ACU GCA AAA	
H71A(+07+30)	ACU GGC CAG AAG UUG AUC AGA GUA	Omisión débil a 100 nM
H71A(+16+39)	GCA GAA UCU ACU GGC CAG AAG UUG	Omisión a 100 nM
H71D(+19-05)	CUC ACG CAG AAU CUA CUG GCC AGA	

15 Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 72

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 72 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

20 Tabla 61: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 72

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 72		
H72A(-8+22)	AAG CUG AGG GGA CGA GGC AGG CCU AUA AGG	Omisión débil a 600 nM
H72A(+02+28)	GUG UGA AAG CUG AGG GGA CGA GGC AGG	Sin omisión
H72D(+14-10)	AGU CUC AUA CCU GCU AGC AUA AUG	Sin omisión

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 73

25 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 73 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 62: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 73

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 73		
H73A(+24+49)	AUG CUA UCA UUU AGA UAA GAU CCA U	Omisión débil
H73A(-16+10)	UUC UGC UAG CCU GAU AAA AAA CGU AA	Débil hasta 25 nM
H73A(+02+26)	CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G	Fuerte hasta 25 nM
H73D(+23-02)	ACA UGC UCU CAU UAG GAG AGA UGC U	Omisión hasta 25 nM
HM73A(+19+44)	UAU CAU UUA GAU AAG AUC CAU UGC UG	Omisión débil hasta 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 74

Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 74 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

5 Tabla 66: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 74

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
HM74A(+20+46)	GUU CAA ACU UUG GCA GUA AUG CUG GAU	Omisión a 25 nM
HM74A(+50+77)	GAC UAC GAG GCU GGC UCA GGG GGG AGU C	100 % de omisión a 25 nM
HM74A(+96+122)	GCU CCC CUC UUU CCU CAC UCU CUA AGG	Omisión a 25 nM

Oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 76

10 Se prepararon oligonucleótidos antisentido dirigidos al exón 76 y se sometieron a ensayo para su capacidad de inducir omisión exónica en células musculares humanas usando métodos similares a los descritos anteriormente.

Tabla 63: secuencias de moléculas antisentido sometidas a ensayo para determinar si inducen la omisión del exón 76

Nombre del oligonucleótido antisentido	Secuencia	Capacidad de inducir omisión
Exón 76		
H76A(-02+25)	CAU UCA CUU UGG CCU CUG CCU GGG GCU	Sin omisión detectable
H76A(+80+106)	GAC UGC CAA CCA CUC GGA GCA GCA UAG	Sin omisión detectable

15 Las modificaciones de los modos anteriormente descritos para llevar a cabo las diversas realizaciones de la presente invención resultarán evidentes para el experto en la materia basándose en las enseñanzas anteriores relacionadas con la invención dada a conocer. Las realizaciones anteriores de la invención son meramente ejemplares y no deben interpretarse en modo alguno como limitativas.

20 **LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> UWA

<120> Moléculas antisentido y métodos de tratamiento de patologías

25 <130> 203594

<160> 59

30 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 1  
 aaaccaagag ucaguuuaug auuuccaucu a 31

40 <210> 2  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

45 <400> 2  
 ucuucuguuu uuguuagcca guca 24

50 <210> 3  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

55 <400> 3  
 guggugguga cagccuguga aaucugugag 30

ES 2 693 459 T3

<210> 4  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 4  
 uguucccuug uggucaccgu aguuac 26  
 <210> 5  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 10  
 <400> 5  
 cacaaagucu gcauccagga acauggguc 29  
 <210> 6  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 6  
 aaggccacaa agucugcauc caggaacaug 30  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 25  
 <400> 7  
 cugcaauucc ccgagucucu gc 22  
 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 35  
 <400> 8  
 caagggcagg ccauuccucc uuc 23  
 <210> 9  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <400> 9  
 gagagcuucc uguagcuuca cccuuu 26  
 <210> 10  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 50  
 <400> 10  
 uguucagcuu cuguuagcca cuga 24  
 <210> 11  
 <211> 34  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 60  
 <400> 11  
 gcugcccaau gccauccugg aguuccugua agau 34  
 <210> 12  
 <211> 29  
 65

<212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 12  
 5 uccagguuca agugggauac uagcaaugu 29  
  
 <210> 13  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 10 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 13  
 uggcgcaggg gcaacucuuc caccaguaa 29  
  
 <210> 14  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 15  
  
 <400> 14  
 20 acaaaugcug cccuuuagac aaaauc 26  
  
 <210> 15  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 25  
  
 <400> 15  
 30 ggcugcuuug ccucagcuc uugaagu 27  
  
 <210> 16  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 35  
  
 <400> 16  
 uggucucauc ugcagaauaa ucccggagaa g 31.  
 40  
  
 <210> 17  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 17  
 45 cagccucucg cucacucacc cugcaaagga 30  
  
 <210> 18  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 50  
  
 <400> 18  
 ccaaacgucu uuquaacagg acugcau 27  
 55  
  
 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 19  
 60 ccacuugaag uucauguuau ccaaacgucu 30  
  
 <210> 20  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 65

ES 2 693 459 T3

<400> 20  
 aacuggcuuc caaaugggac cugaaaaaga 30

5 <210> 21  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 21  
 uucguacagu cucaagagua cucaugauua c 31

15 <210> 22  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 22  
 caauuaccuc ugggcuccug guag 24

25 <210> 23  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 23  
 cuauuuuucu cugccaguca gcgga 25

30 <210> 24  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

35 <400> 24  
 cgagcaaggu cauugacgug gcucacguuc 30

40 <210> 25  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 25  
 gggcuucaug cagcugccug acucgguccu c 31

45 <210> 26  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 26  
 uagggcacuu uguuuggcga gauggcucuc 30

55 <210> 27  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 27  
 gagcucuguc auuuugggau ggucccagca 30

60 <210> 28  
 <211> 29  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

65 <400> 28  
 cugcagucuu cggaguuuca uggcagucc 29

ES 2 693 459 T3

<210> 29  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
  
 <400> 29  
 gauccucccu guucgucucc uauuaug 27  
  
 10  
 <210> 30  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 15  
 <400> 30  
 gcgcugguca caaaauccug uugaacuugc 30  
  
 20  
 <210> 31  
 <211> 31  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 25  
 <400> 31  
 uaggaggcgc cucccauccu guaggucacu g 31  
  
 30  
 <210> 32  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 35  
 <400> 32  
 gccucugacag gccuucgagg agguc 25  
  
 40  
 <210> 33  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 45  
 <400> 33  
 uguucagggc augaacucuu guggauccuu 30  
  
 50  
 <210> 34  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 55  
 <400> 34  
 guacuacuua cauuauuguu cugca 25  
  
 60  
 <210> 35  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 65  
 <400> 35  
 uaucuggaua ggugguauca acaucuguaa 30  
  
 70  
 <210> 36  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 693 459 T3

<400> 36  
 auguaacuga aaauguucuu cuuua 25  
  
 5 <210> 37  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 10 <400> 37  
 caggagcuuc caaaugcugc a 21  
  
 15 <210> 38  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <400> 38  
 uccucagcag aaagaagcca cg 22  
  
 25 <210> 39  
 <211> 26  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 30 <400> 39  
 ccuccuuucu ggcauagacc uccac 26  
  
 35 <210> 40  
 <211> 27  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 40 <400> 40  
 cuuacaguuu ucuccaaacc ucccuuc 27  
  
 45 <210> 41  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 50 <400> 41  
 ugugucaucc auucgugcau cucug 25  
  
 55 <210> 42  
 <211> 25  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 60 <400> 42  
 cugguauucc uaaauuguac agaga 25  
  
 65 <210> 43  
 <211> 30  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 43  
 ugugaugugg uccacauucu ggucaaaagu 30  
  
 <210> 44  
 <211> 28  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

ES 2 693 459 T3

	<400> 44 cuuguuucuc agguaaagcu cuggaaac	28
5	<210> 45 <211> 28 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 45 caagcugccc aaggucuuuu auuugagc	28
15	<210> 46 <211> 30 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 46 uccagagugc ugagguuaua cggugagagc	30
25	<210> 47 <211> 30 <212> ARN <213> Homo sapiens	
30	<400> 47 cuggcgagca agguccuuga cguggcucac	30
35	<210> 48 <211> 30 <212> ARN <213> Homo sapiens	
40	<400> 48 caggacacgg auccucccug uucgucccu	30
45	<210> 49 <211> 30 <212> ARN <213> Homo sapiens	
50	<400> 49 uaauauacac gacuuacauc uguacuuguc	30
55	<210> 50 <211> 25 <212> ARN <213> Homo sapiens	
60	<400> 50 caccauggac ugggguucca gucuc	25
65	<210> 51 <211> 26 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 51 uaccugaauc caaugauugg acacuc	26
	<210> 52 <211> 30 <212> ARN <213> Homo sapiens	

ES 2 693 459 T3

	<400> 52 cuguuccaau cagcuuacuu cccaauugua	30
5	<210> 53 <211> 28 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 53 cagucuuca acucuuucag uuucugau	28
15	<210> 54 <211> 27 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 54 cuguucagcu ucuguuagcc acugauu	27
25	<210> 55 <211> 28 <212> ARN <213> Homo sapiens	
30	<400> 55 gcugcccaau gccauccugg aguuccug	28
35	<210> 56 <211> 30 <212> ARN <213> Homo sapiens	
40	<400> 56 guugcugcuc uuuuccaggu ucaaguggga	30
45	<210> 57 <211> 29 <212> ARN <213> Homo sapiens	
50	<400> 57 agcagguacc uccaacauca aggaagaug	29
55	<210> 58 <211> 33 <212> ARN <213> Homo sapiens	
60	<400> 58 uccaacuggg gacgccucug uuccaaaucc ugc	33
65	<210> 59 <211> 33 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 59 uucaacuguu gccuccgguu cugaaggugu ucu	33
	<210> 60 <211> 25 <212> ARN <213> Homo sapiens	

# ES 2 693 459 T3

<400> 60  
cauugcuguu uuccauuucu gguag 25

5  
<210> 61  
<211> 31  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

10  
<400> 61  
gcugcccaau gccauccugg aguuccugua a 31

15  
<210> 62  
<211> 31  
<212> ARN  
<213> Homo sapiens

20  
<400> 62  
caaugccauc cuggaguucc uguaagauac c 31

**REIVINDICACIONES**

1. Oligonucleótido antisentido que induce la omisión del exón 45 en un pre-ARNm de distrofina humana, en el que el oligonucleótido antisentido se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 i) un oligonucleótido antisentido de 22 bases que comprenden CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 ii) un oligonucleótido antisentido de 22 bases que comprende CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 10 iii) un oligonucleótido antisentido de 25 bases que comprende GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 iv) un oligonucleótido antisentido de 25 bases que comprende GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 15 v) un oligonucleótido antisentido de 28 bases que comprende GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 vi) un oligonucleótido antisentido de 28 bases que comprende GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,  
 vii) un oligonucleótido antisentido de 31 bases que comprende GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y  
 20 viii) un oligonucleótido antisentido de 31 bases que comprende GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 22 bases que comprenden CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 3. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 22 bases que comprenden CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 4. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 25 bases que comprenden CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
5. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 25 bases que comprenden GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 35 6. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 28 bases que comprenden GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 40 7. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 28 bases que comprenden GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 45 8. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 31 bases que comprenden GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 50 9. Oligonucleótido antisentido según la reivindicación 1, en el que el oligonucleótido antisentido son 31 bases que comprenden GCC GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G y que comprende una base pirimidina 5-sustituida o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 55 10. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende una base 5-metilcitosina.
11. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el oligonucleótido no activa la ARNasa H.
- 60 12. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los enlaces internucleósido del esqueleto son sustituidos por enlaces internucleósido no naturales.
13. Oligonucleótidos antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según las reivindicaciones 1 a 9, en el que los enlaces internucleósido son fosfatos modificados.

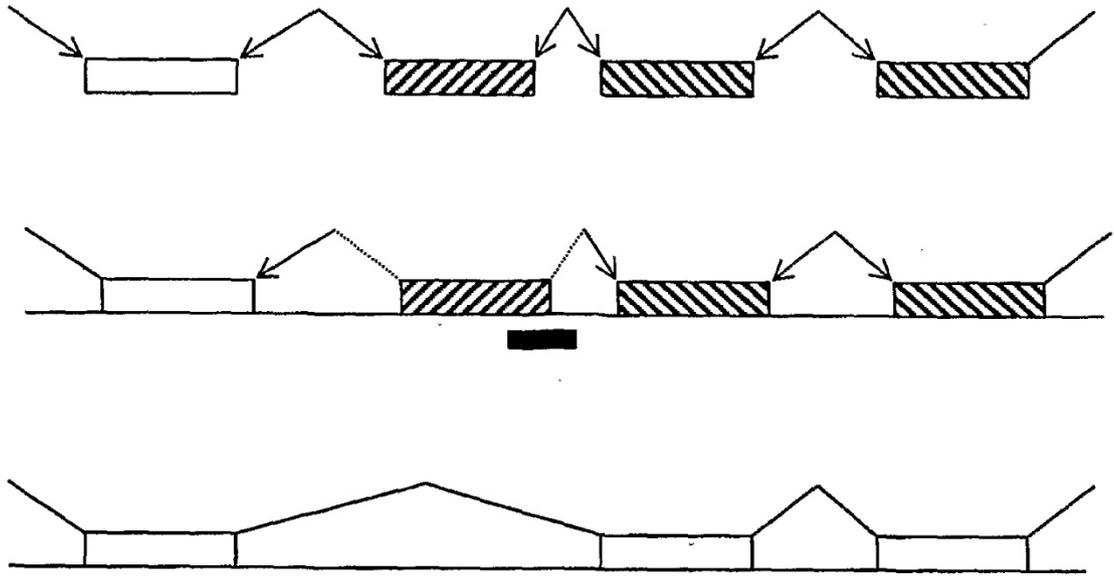
14. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según la reivindicación 13, en el que el fosfato modificado se selecciona de fosfonatos de metilo, fosforotioatos de metilo, fosforomorfolidatos, fosforopiperazidatos y fosforoamidatos.
- 5 15. Oligonucleótidos antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oligonucleótido es un ácido péptido-nucleico.
- 10 16. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el oligonucleótido se une químicamente a una o más fracciones o conjugados que intensifican la actividad, la distribución celular, o la captación celular del oligonucleótido antisentido.
17. Composición, que comprende un oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 15 18. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, o una composición según la reivindicación 17, para su uso en un método de tratamiento de la distrofia muscular.
- 20 19. Utilización de un oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, o una composición según la reivindicación 17 para la preparación de un medicamento para la modulación de la distrofia muscular.
- 25 20. Oligonucleótido antisentido o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o composición para la utilización según la reivindicación 18, o la utilización según la reivindicación 19, en el que la distrofia muscular es distrofia muscular de Duchenne.

30

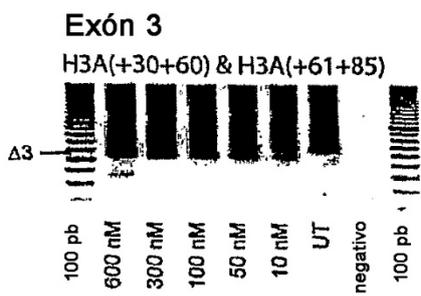
FIGURA 1.

pb	Aceptor	ESE	Donante
u	a ugcacugagug ccucuuucucg	cagG	CGgucucu u

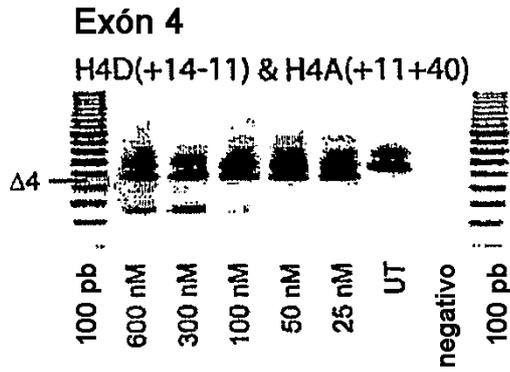
**Figura 2**



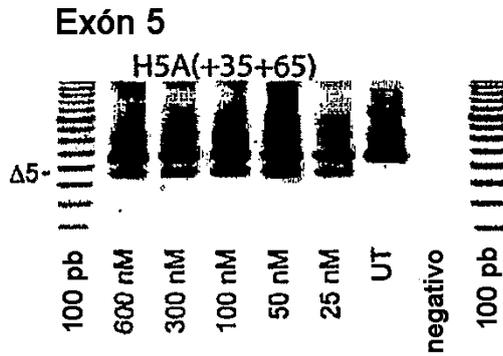
**Figura 3**



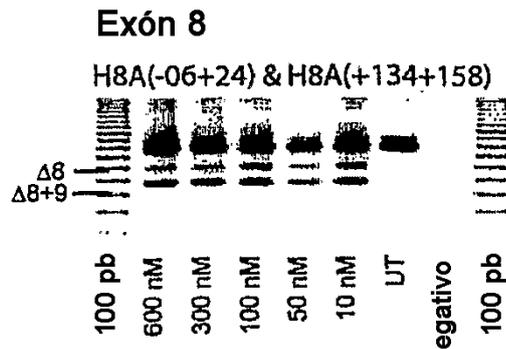
### Figura 4



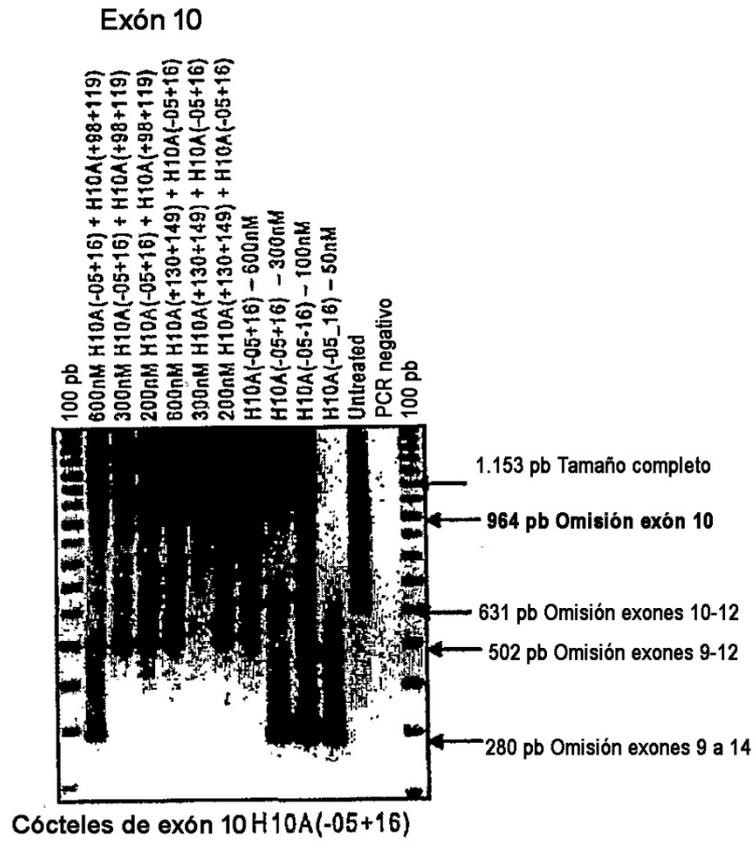
### Figura 5



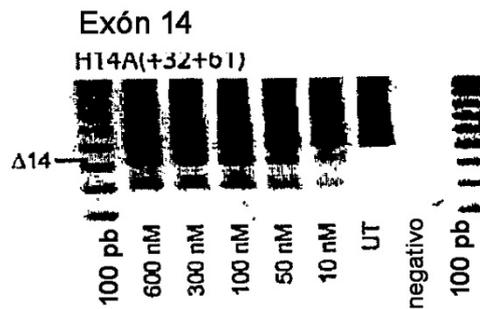
### Figura 6



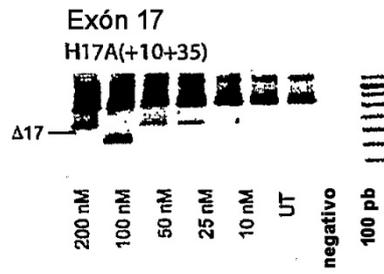
## Figura 7



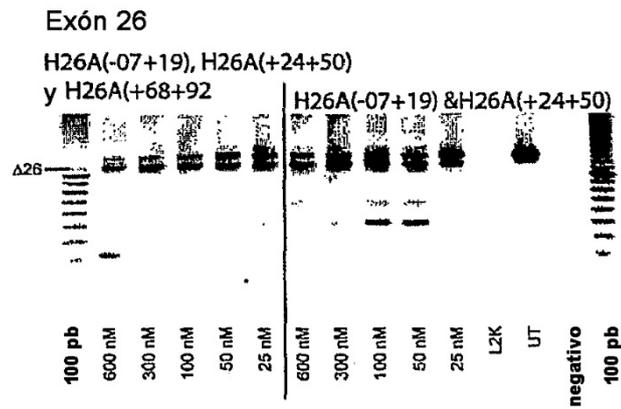
## Figura 8



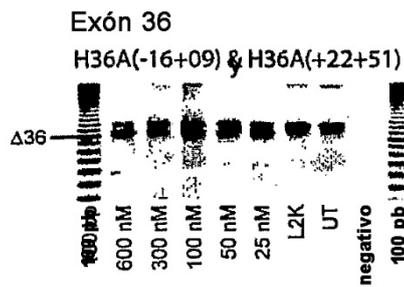
**Figura 9**



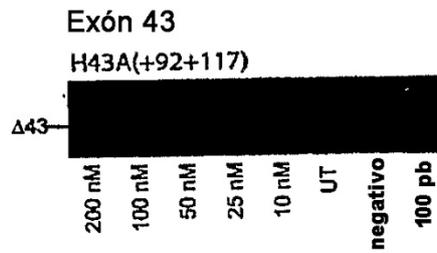
**Figura 10**



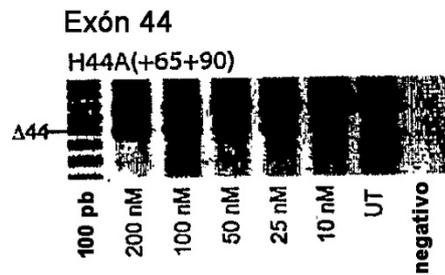
**Figura 11**



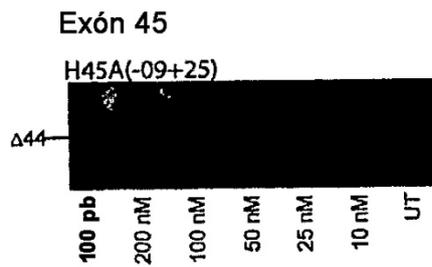
## Figura 12



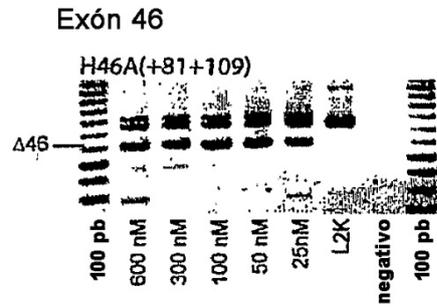
## Figura 13



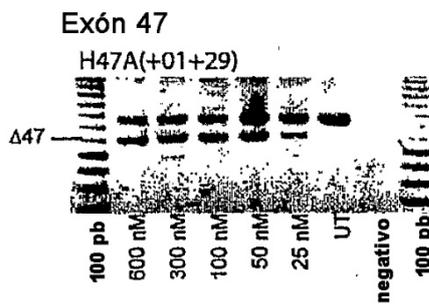
## Figura 14



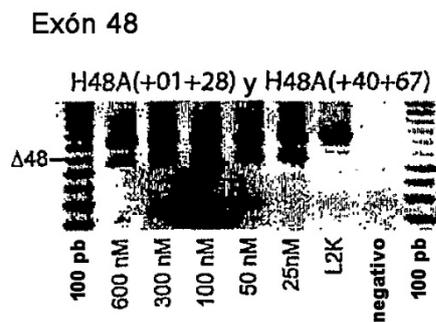
### Figura 15



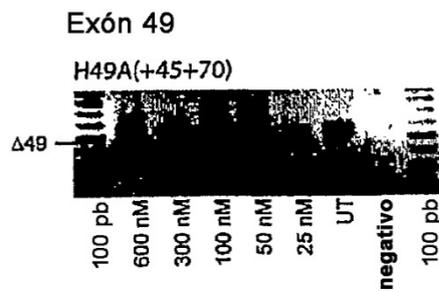
### Figura 16



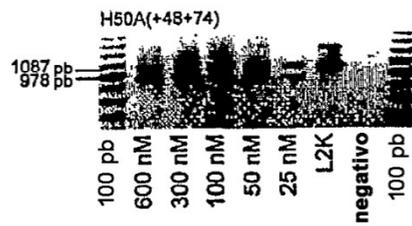
### Figura 17



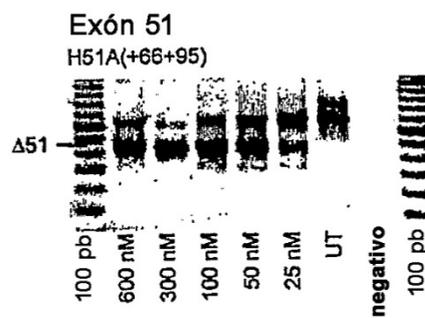
### Figura 18



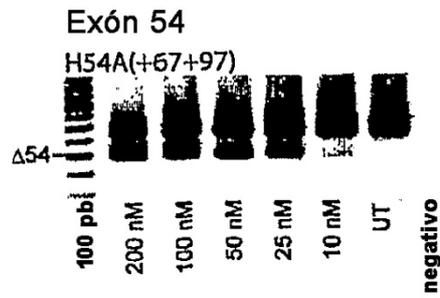
### Figura 19



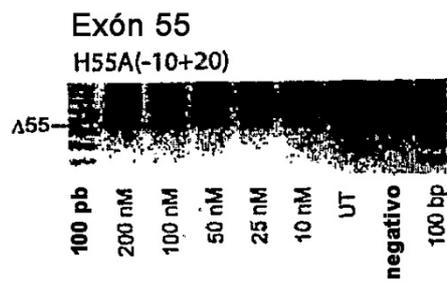
### Figura 20



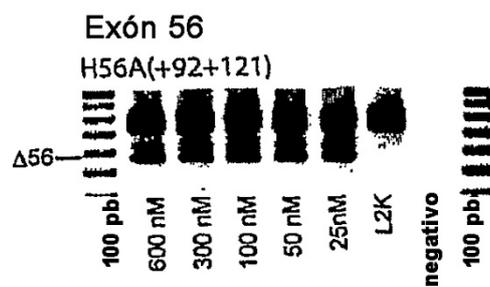
## Figura 21



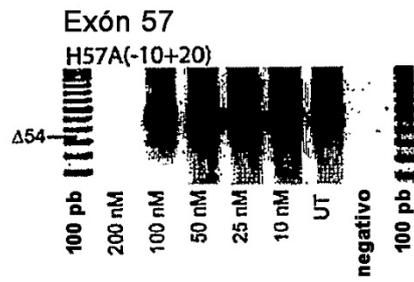
## Figura 22



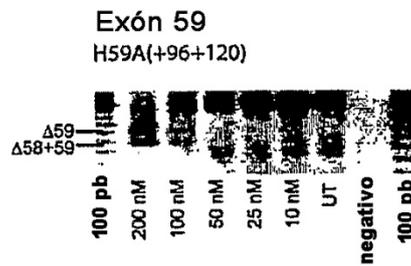
## Figura 23



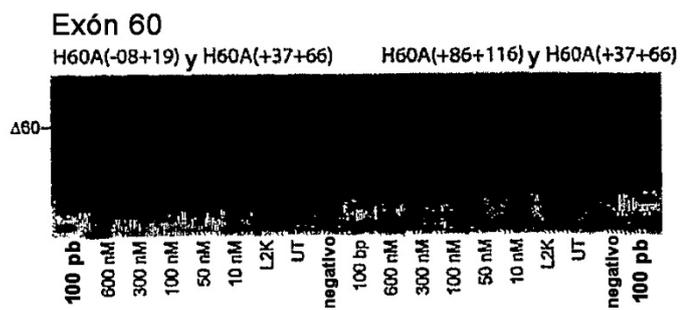
**Figura 24**



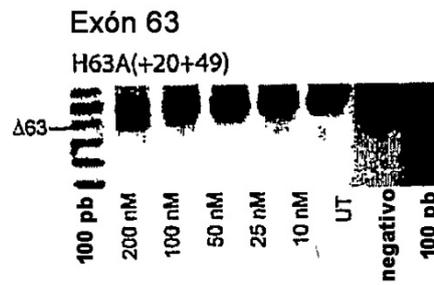
**Figura 25**



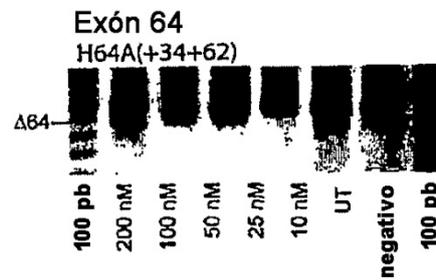
**Figura 26**



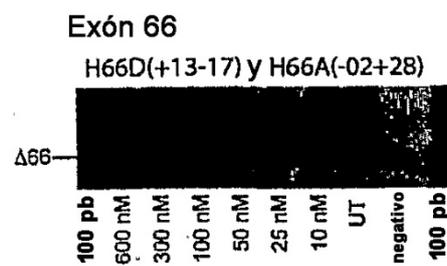
### Figura 27



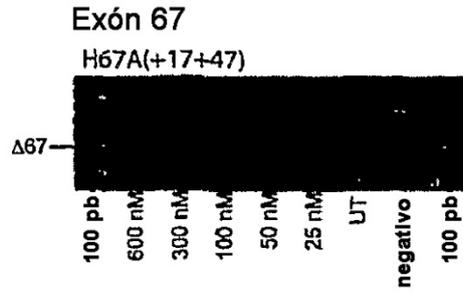
### Figura 28



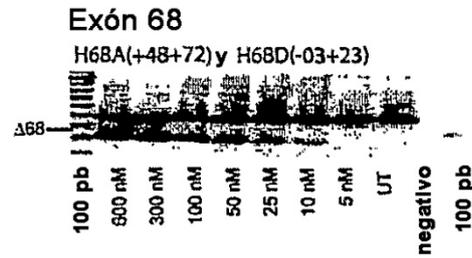
### Figura 29



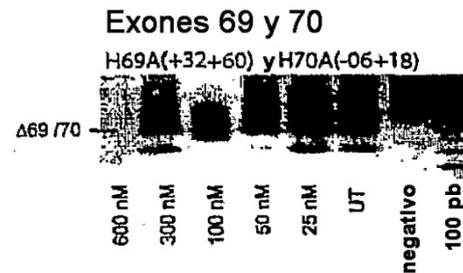
### Figura 30



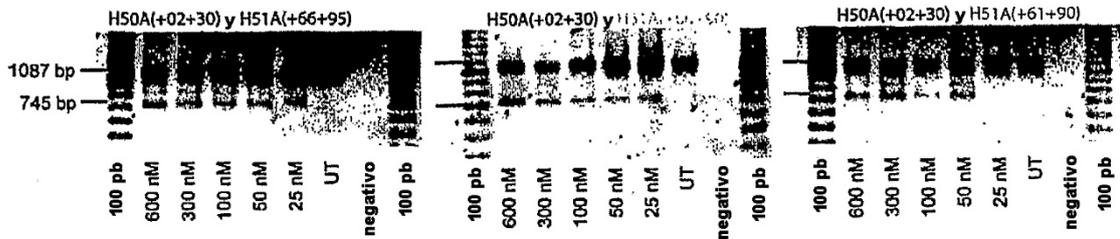
### Figura 31



### Figura 32



**Figura 33**



**Figura 34**

**Mejor cóctel de 50/51**

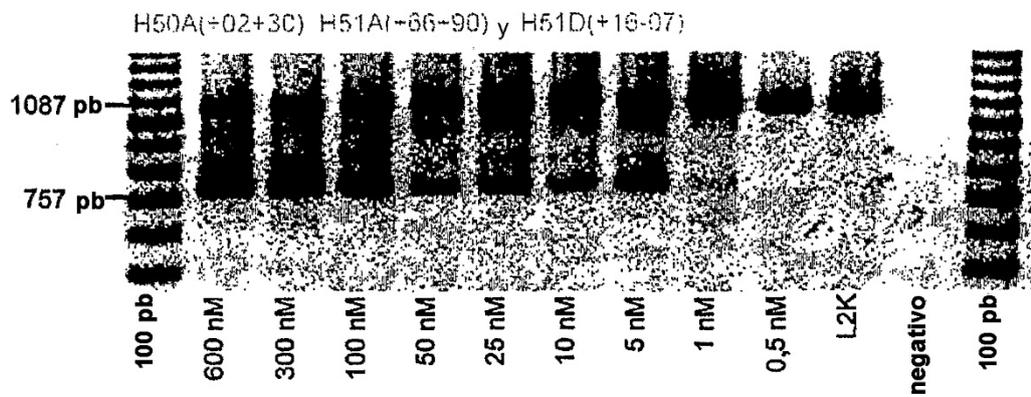


Figura 35

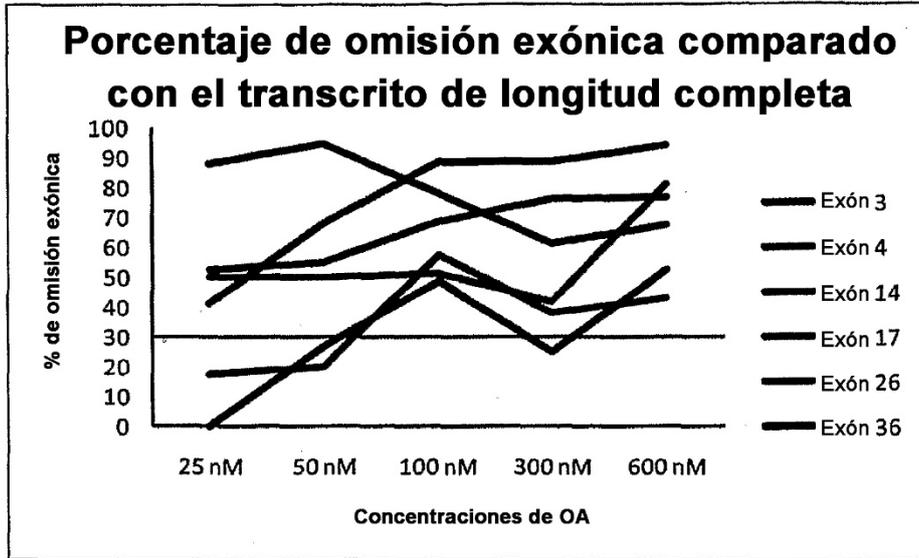
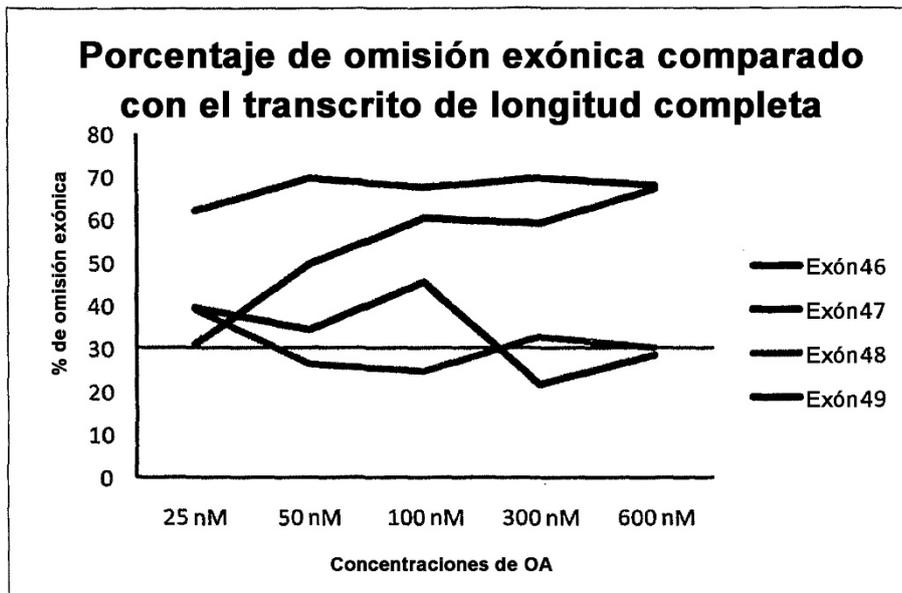


Figura 36



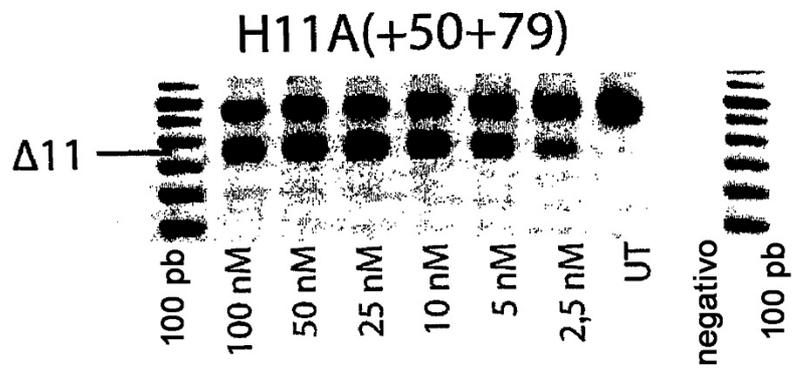


Figura 37

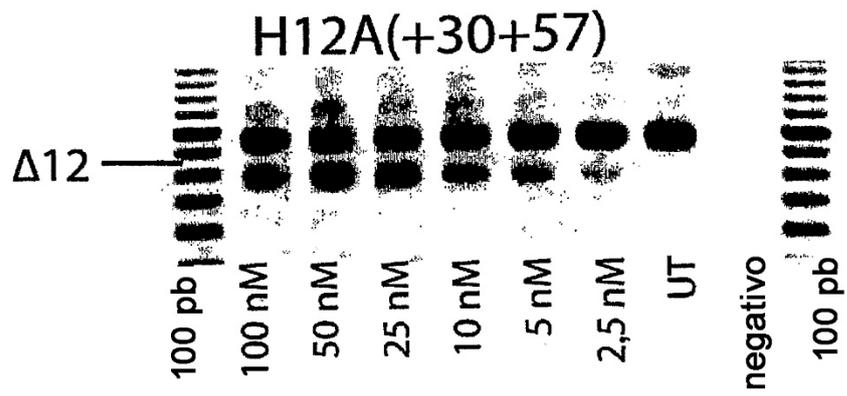


Figura 38

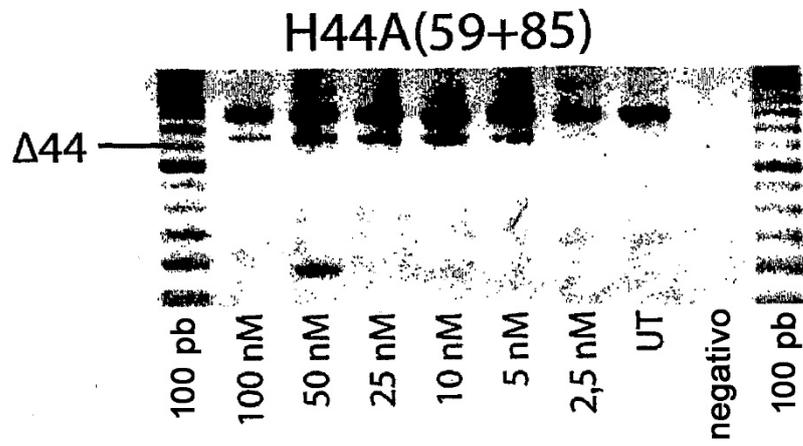


Figura 39

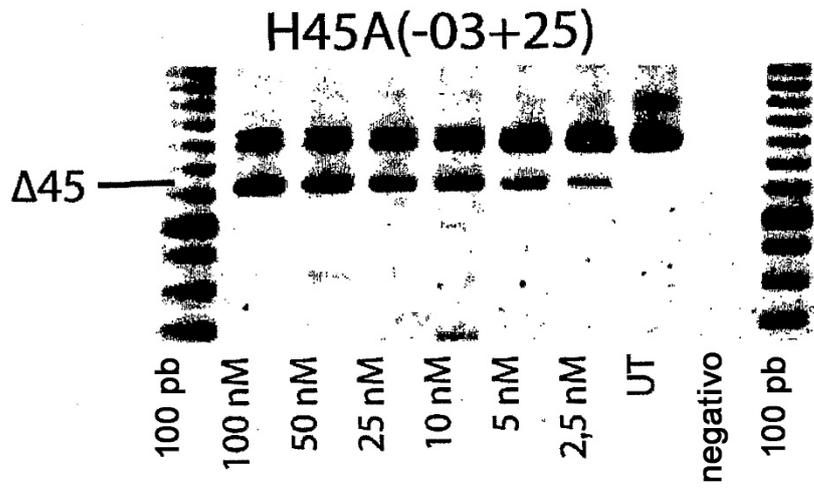
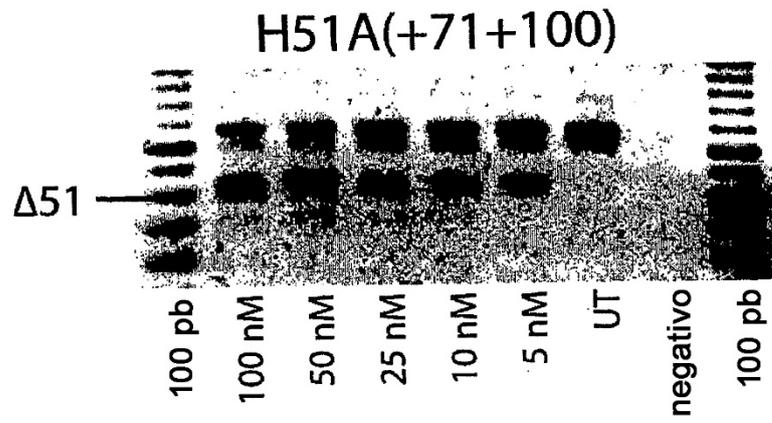
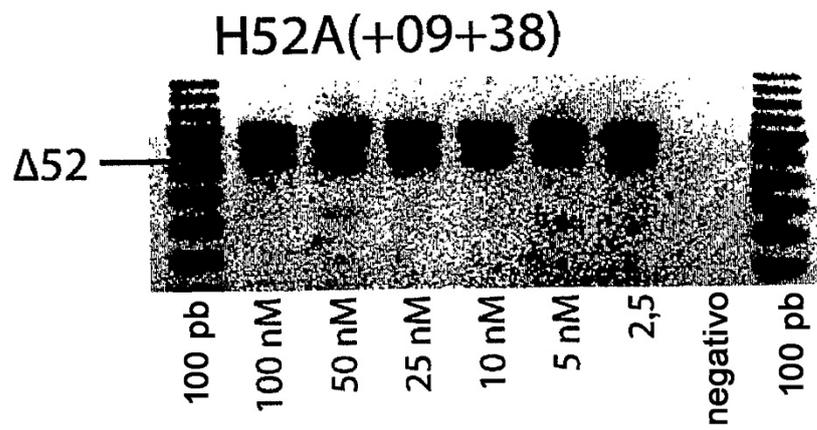


Figura 40



**Figura 41**



**Figura 42**

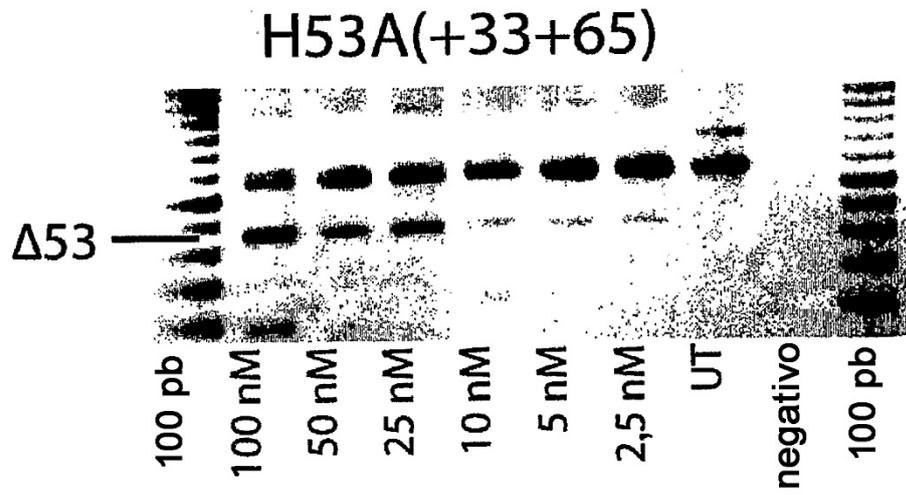


Figura 43

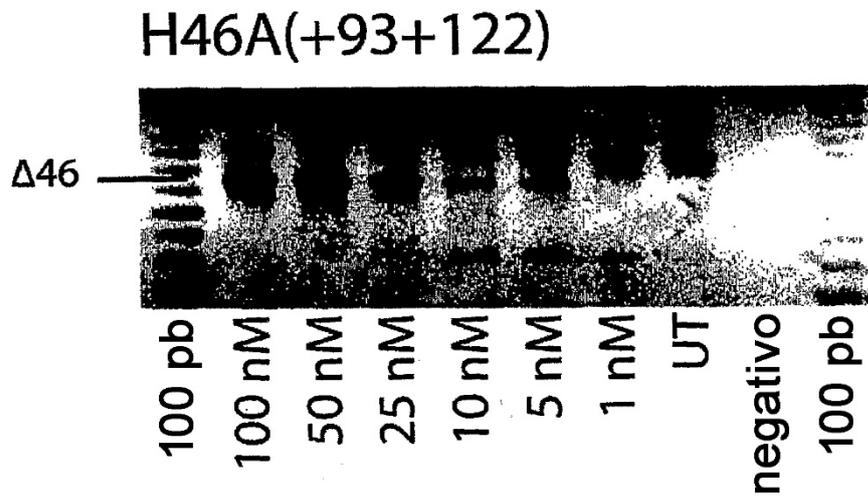


Figura 44

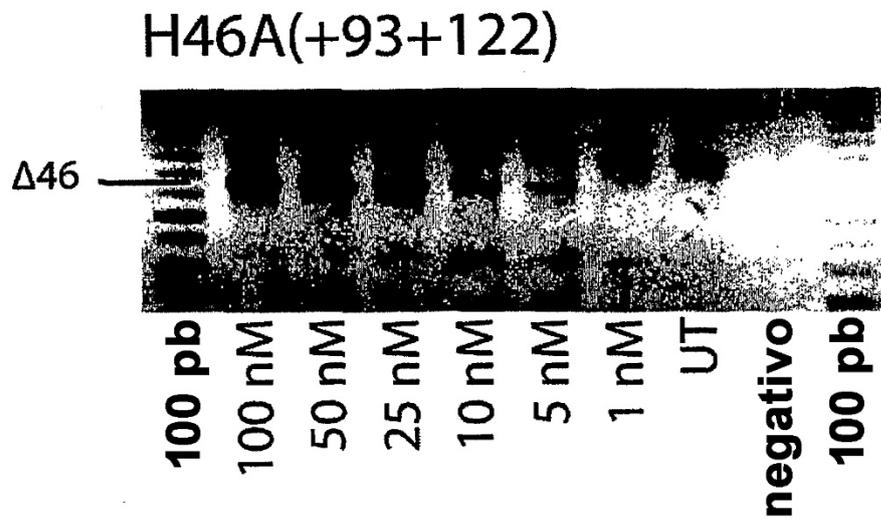


Figura 45

**Figura 46A**

SEC ID	Exón	Secuencia
1	H5A(+35+65)	AAA CCA AGA GUC AGU UUA UGA UUU CCA UCU A
2	H12A(+52+75)	UCU UCU GUU UUU GUU AGC CAG UCA
3	H17A(-07+23)	GUG GUG GUG ACA GCC UGU GAA AUC UGU GAG
4	H17A(+61+86)	UGU UCC CUU GUG GUC ACC GUA GUU AC
5	H21A(+86+114)	CAC AAA GUC UGC AUC CAG GAA CAU GGG UC
6	H21A(+90+119)	AAG GCC ACA AAG UCU GCA UCC AGG AAC AUG
7	H22A(+125+146)	CUG CAA UUC CCC GAG UCU CUG C
8	H24A(+51+73)	CAA GGG CAG GCC AUU CCU CCU UC
9	H43A(+92 +117)	GAG AGC UUC CUG UAG CUU CAC CCU UU
10	H44A(+65+90)	UGU UCA GCU UCU GUU AGC CAC UGA
11	H45A (-09+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA U
12	H46A(+81+109)	UCC AGG UUC AAG UGG GAU ACU AGC AAU GU
13	H47A(+01+29)	UGG CGC AGG GGC AAC UCU UCC ACC AGU AA
14	H49A(+45+70)	ACA AAU GCU GCC CUU UAG ACA AAA UC
15	H50A(+48+74)	GGC UGC UUU GCC CUC AGC UCU UGA AGU
16	H54A(+67+97)	UGG UCU CAU CUG CAG AAU AAU CCC GGA GAA G
17	H55A(-10 +20)	CAG CCU CUC GCU CAC UCA CCC UGC AAA GGA
18	H56A(+92+121)	CCA AAC GUC UUU GUA ACA GGA CUG CAU
19	H56A(+112+141)	CCA CUU GAA GUU CAU GUU AUC CAA ACG UCU
20	H57A(-10+20)	AAC UGG CUU CCA AAU GGG ACC UGA AAA AGA
21	H58A(+34+64)	UUC GUA CAG UCU CAA GAG UAC UCA UGA UUA C
22	H58D(+17-07)	CAA UUA CCU CUG GGC UCC UGG UAG
23	H59A(+96 +120)	CUA UUU UUC UCU GCC AGU CAG CGG A
24	H60A(+33+62)	CGA GCA AGG UCA UUG ACG UGG CUC ACG UUC
25	H61A(+10+40)	GGG CUU CAU GCA GCU GCC UGA CUC GGU CCU C
26	H62A(23+52)	UAG GGC ACU UUG UUU GGC GAG AUG GCU CUC
27	H63A(+20+49)	GAG CUC UGU CAU UUU GGG AUG GUC CCA GCA
28	H64A(+34+62)	CUG CAG UCU UCG GAG UUU CAU GGC.AGU CC
29	H66A(-8+19)	GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU AUU AUG
30	H67A(+17+47)	GCG CUG GUC ACA AAA UCC UGU UGA ACU UGC
31	H3A(+30+60)	UAG GAG GCG CCU CCC AUC CUG UAG GUC ACU G
32	H3A(+61+85)	G CCC UGU CAG GCC UUC GAG GAG GUC
33	H4A(+11+40)	UGU UCA GGG CAU GAA CUC UUG UGG.AUC CUU
34	H4D(+14-11)	GUA CUA CUU ACA UUA UUG UUC.UGC A
35	H8A(-06+24)	UAU CUG GAU AGG UGG UAU CAA CAU CUG UAA

**Figura 46B**

SEC ID	Exón	Secuencia
36	H8A(+134+158)	AUG UAA CUG AAA AUG UUC UUC UUU A
37	H10A(-05+16)	CAG GAG CUU CCA AAU GCU GCA
38	H10A(+98+119)	UCC UCA GCA GAA AGA AGC CAC G
39	H26A(-07+19)	CCU CCU UUC UGG CAU AGA CCU UCC AC
40	H26A(+24+50)	CUU ACA GUU UUC UCC AAA CCU CCC UUC
41	H26A(+68+92)	UGU GUC AUC CAU UCG UGC AUC UCU G
42	H36A(-16+09)	CUG GUA UUC CUU AAU UGU ACA GAG A
43	H36A(+22+51)	UGU GAU GUG GUC CAC AUU CUG GUC AAA AGU
44	H48A(+01+28)	CUU GUU UCU CAG GUA AAG CUC UGG AAA C
45	H48A(+40+67)	CAA GCU GCC CAA GGU CUU UUA UUU GAG C
46	H60A(+87+116)	UCC AGA GUG CUG AGG UUA UAC GGU GAG AGC
47	H60A(+37+66)	CUG GCG AGC AAG GUC CUU GAC GUG GCU CAC
48	H66A(-02+28)	CAG GAC ACG GAU CCU CCC UGU UCG UCC CCU
49	H66D(+13-17)	UAA UAU ACA CGA CUU ACA UCU GUA CUU GUC
50	H68A(+48+72)	CAC CAU GGA CUG GGG UUC CAG UCU C
51	H68D(+23-03)	UAC CUG AAU CCA AUG AUU GGA CAC UC
52	H11A(+50+79)	CUG UUC CAA UCA GCU UAC UUC CCA AUU GUA
53	H12A(+30+57)	CAG UCA UUC AAC UCU UUC AGU UUC UGA U
54	H44A(+59+85)	CUG UUC AGC UUC UGU UAG CCA CUG AUU
55	H45A(-03+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU G
56	H46A(+93+122)	GUU GCU GCU CUU UUC CAG GUU CAA GUG GGA
57	H51A(+71+100)	AGC AGG UAC CUC CAA CAU CAA GGA AGA UG
58	H52A(+09+38)	UCC AAC UGG GGA CGC CUC UGU UCC AAA UCC UGC
59	H53A(+33+65)	UUC AAC UGU UGC CUC CGG UUC UGA AGG UGU UCU
60	H73A(+02+26)	CAU UGC UGU UUU CCA UUU CUG GUA G
61	H45A(-06+25)	GCU GCC CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA A
62	H45A(-12+19)	CAA UGC CAU CCU GGA GUU CCU GUA AGA UAC C