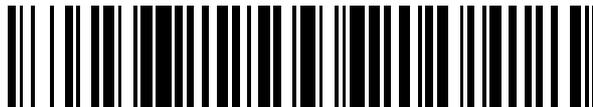


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 758 982**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.07.2013 PCT/NL2013/050487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.01.2014 WO14007620**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.07.2013 E 13739847 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2870246**

54 Título: **Oligonucleótido para el tratamiento de pacientes con distrofia muscular**

30 Prioridad:

03.07.2012 EP 12174781
03.07.2012 US 201261667517 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2020

73 Titular/es:

BIOMARIN TECHNOLOGIES B.V. (100.0%)
J.H. Oortweg 21
2333 CH Leiden, NL

72 Inventor/es:

VAN DEUTEKOM, JUDITH CHRISTINA
THEODORA

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 758 982 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

Oligonucleótido para el tratamiento de pacientes con distrofia muscular

Campo de la invención

5 La invención se refiere al campo de la genética humana, más específicamente a un método para diseñar un monooligonucleótido que es preferiblemente capaz de inducir la omisión (salto) de dos o más exones de un pre-ARNm. La invención proporciona, además de dicho oligonucleótido, una composición farmacéutica que comprende dicho oligonucleótido, y el uso de dicho oligonucleótido como se identifica en la presente memoria.

Antecedentes de la invención

10 Los oligonucleótidos están surgiendo en la medicina para tratar trastornos genéticos como la distrofia muscular. La distrofia muscular (DM) se refiere a enfermedades genéticas que se caracterizan por una paresia y degeneración progresivas de los músculos esqueléticos. La distrofia muscular de Duchenne (DMD) y la distrofia muscular de Becker (DMB), son las formas más comunes de distrofia muscular en la infancia y se usan en la presente memoria para ilustrar la invención. La DMD es un trastorno neuromuscular letal grave que produce una dependencia de ayuda de silla de
15 ruedas antes de los 12 años y los pacientes con DMD frecuentemente mueren antes de los 30 años debido a insuficiencia respiratoria o cardíaca.

La DMD está causada por mutaciones en el gen DMD; principalmente por deleciones o duplicaciones con desplazamiento de marco de uno o más exones, por pequeñas inserciones o deleciones de nucleótidos, o por mutaciones puntuales finalizadoras (*nonsense*), que normalmente dan como resultado la ausencia de distrofina funcional. Durante la última década, la modificación de corte y empalme específicamente inducida para restablecer el
20 marco de lectura alterado del transcrito de DMD ha surgido como una terapia prometedora para la distrofia muscular de Duchenne (DMD) (van Ommen GJ et al, Yokota T., et al, van Deutekom et al., Goemans N.M., et al.). Usando oligonucleótidos antisentido (OAS) de secuencia específica que se dirigen a un exón específico que flanquea o contiene la mutación e interfieren con sus señales de corte y empalme, la omisión de ese exón se puede inducir durante el procesamiento del pre-ARNm de DMD. A pesar de la transcripción truncada resultante, se restablece el
25 marco abierto de lectura y se introduce una proteína que es similar a las que se encuentran en los pacientes con distrofia muscular de Becker normalmente más leve. La omisión del exón inducida por OAS proporciona un enfoque terapéutico específico de mutación y, por lo tanto, posiblemente personalizado para pacientes con DMD y para pacientes específicos con DMB grave. Como la mayoría de las mutaciones se agrupan alrededor de los exones 45 a 55 en el gen DMD, la omisión de un exón específico en esa región puede ser terapéutica para una subpoblación de
30 pacientes con una variedad de mutaciones. La omisión del exón 51 afecta a las subpoblaciones más grandes de pacientes (aproximadamente el 13 %), incluidos aquellos con deleciones de los exones 45 a 50, 48 a 50, 50 o 52. Para algunas mutaciones, para restablecer el marco abierto de lectura se requiere omitir más de un exón. Por ejemplo, para pacientes con DMD con una deleción del exón 46 al exón 50 en el gen DMD, solo sería correctiva la omisión de los exones 45 y 51. Para tratar a estos pacientes, se requiere la administración de dos oligonucleótidos, uno dirigido al
35 exón 45 y el otro al exón 51. La viabilidad de omitir dos o múltiples exones consecutivos usando una combinación de OAS, ya sea en un cóctel o en construcciones genéticas suministradas por virus, ha sido objeto de intensos estudios (Aartsma-Rus A. et al., 2004; Bérout C., et al.; Van Vliet L., et al.; Yokota T., et al.; Goyenvalle A., et al.). La omisión de múltiples exones sería aplicable a subpoblaciones combinadas de pacientes, lo que permitiría imitar las deleciones que se sabe que están asociadas a fenotipos relativamente leves, y proporcionaría una herramienta para abordar mutaciones raras fuera de la región de deleción de puntos calientes en el gen DMD. Sin embargo, un inconveniente para el desarrollo de fármacos que comprenden múltiples oligonucleótidos es que las autoridades reguladoras de fármacos pueden considerar los oligonucleótidos de diferentes secuencias como fármacos diferentes, requiriendo cada uno de ellos demostrar una producción estable, y ensayos clínicos y de toxicidad. Por lo tanto, existe la necesidad de
40 un compuesto molecular sencillo capaz de inducir la omisión de al menos dos exones para facilitar el tratamiento de subgrupos combinados de pacientes con DMD.

Descripción de la invención

La invención proporciona un método para diseñar un monooligonucleótido, en donde dicho oligonucleótido puede unirse a una región de un primer exón y a una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm, en donde
50 dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón. Los oligonucleótidos obtenibles mediante dicho método son preferiblemente capaces de inducir la omisión de dicho primer exón y dicho segundo exones de dicho pre-ARNm. Preferiblemente, también se induce la omisión de uno o más exones adicionales, en donde dicho uno o más exones adicionales se localizan preferiblemente entre dicho primer y dicho segundo exones. La transcripción resultante de dicho pre-ARNm, en donde se omiten dichos exones, está en marco.

55 Oligonucleótido

En un primer aspecto, la invención se refiere a un oligonucleótido que puede unirse a una región de un primer exón y a una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm, en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón.

Este oligonucleótido es preferiblemente capaz de inducir la omisión de dichos primer y segundo exones de dicho pre-ARNm; más preferiblemente se induce la omisión de uno o más exones adicionales, en donde dichos uno o más exones adicionales se localizan preferiblemente entre dichos primer y dicho segundo exones, y en donde la transcripción resultante está en marco (de lectura).

5 La omisión de exones interfiere con los procesos naturales de corte y empalme que ocurren en una célula eucariota. En eucariotas superiores, la información genética de las proteínas en el ADN de la célula está codificada en exones que están separados entre sí por secuencias intrónicas. Estos intrones son, en algunos casos, muy largos. La maquinaria de transcripción de eucariotas genera un pre-ARNm que contiene exones e intrones, mientras que la maquinaria de corte y empalme, a menudo ya durante la producción en curso del pre-ARNm, genera el ARNm
10 codificante real para la proteína eliminando los intrones y conectando los exones presentes en el pre-ARNm durante un proceso denominado corte y empalme.

Un oligonucleótido de la invención que es capaz de unirse a una región de un primer exón de un pre-ARNm y a una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm, debe interpretarse como un oligonucleótido adecuado para unirse a una región de un primer exón de un pre-ARNm y adecuado para unirse a una región de un segundo exón
15 dentro del mismo pre-ARNm. Dicho oligonucleótido de la invención se caracteriza por su unión característica (es decir, capacidad de unirse), cuando se usa con, o en combinación con, un pre-ARNm, preferiblemente en una célula. Dentro de este contexto, la expresión "capaz de" puede reemplazarse por "poder". Por tanto, el experto en la técnica apreciará que un oligonucleótido capaz de unirse a una región de un primer exón y capaz de unirse a una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm, definido por una secuencia de nucleótidos, define dicho oligonucleótido
20 estructuralmente, es decir, dicho oligonucleótido tiene una secuencia tal que es inversamente complementaria a la secuencia de dicha región de dicho primer exón y también inversamente complementaria a la secuencia de dicha región de dicho segundo exón dentro del mismo pre-ARNm. El grado de complementariedad inversa con dichas regiones de dicho primer y/o segundo exón que se necesita para un oligonucleótido de la invención puede ser inferior al 100 %. Se puede permitir una determinada cantidad de emparejamientos erróneos o uno o dos huecos, como se
25 aborda más adelante en la presente memoria. La secuencia de nucleótidos de una región de un primer exón que tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho segundo exón (o la secuencia de nucleótidos de una región de un segundo exón que tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón), a la cual puede unirse el oligonucleótido de la invención, podría diseñarse usando un método de la invención como se explica más adelante en la presente memoria. El pre-ARNm preferido es un pre-ARNm de distrofina.

30 En la tabla 2 se definen las combinaciones preferidas del primer y segundo exones del pre-ARNm de distrofina y las regiones preferidas de dichos primer y segundo exones de distrofina. El oligonucleótido de la invención es preferiblemente capaz de inducir la omisión de dichos primer y segundo exones de dicho pre-ARNm de distrofina; más preferiblemente se induce la omisión de uno o más exones adicionales, en donde dichos uno o más exones adicionales se localizan preferiblemente entre dichos primer y dicho segundo exones, y en donde la transcripción de distrofina
35 resultante está en marco, preferiblemente como en la Tabla 1.

Una transcripción está en marco cuando tiene un marco abierto de lectura que permite la producción de una proteína. El estado en marco de un ARNm puede evaluarse mediante un análisis de secuencias y/o RT-PCR como sabe un experto en la técnica. La proteína resultante que es el resultado de la traducción de la transcripción en marco se puede analizar mediante inmunofluorescencia y/o análisis de transferencia Western usando anticuerpos que reaccionan en
40 cruzado con dicha proteína, como sabe un experto en la técnica. A lo largo de la invención, puede decirse que un oligonucleótido, como se identifica en la presente memoria, es funcional si mediante RT-PCR y/o análisis de secuencia se identifica una transcripción resultante en marco, o si la proteína resultante de dicha transcripción en el marco se identifica mediante inmunofluorescencia y/o análisis de transferencia Western, en un sistema relevante *in vitro* o *in vivo* dependiendo de la identidad de la transcripción. Si la transcripción es la transcripción de distrofina, un sistema relevante puede ser un miocito, o miotubo, o fibra muscular o miofibra, de un donante sano o un paciente con DMD
45 como se explica más adelante en la presente memoria.

En una realización, una región de un segundo exón (presente dentro del mismo pre-ARNm que una región de un primer exón) tiene una identidad de al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % con una región de un primer exón como se identificó anteriormente (en la Tabla 2 se identifican las regiones preferidas
50 de un primer y un segundo exón de distrofina). El porcentaje de identidad puede evaluarse a lo largo de dicho primer y/o segundo exón o en una región de 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos como se ilustra para los exones de distrofina de la presente memoria. Está claro para el experto en la técnica, que un primer y un segundo exón, como se identifica en la presente memoria, son dos exones distintos de un solo pre-ARNm o dos exones distintos dentro del mismo pre-ARNm. Un primer exón, como se identifica en la presente memoria, puede localizarse cadena arriba (es decir, en dirección 5') del segundo exón dentro del mismo pre-ARNm que se identifica en la presente memoria, o dicho segundo exón puede estar cadena arriba de dicho primer exón.
55

60 Preferiblemente, dicho primer exón se localiza cadena arriba de dicho segundo exón. Está claro para un experto en la técnica que un oligonucleótido de la invención puede diseñarse principalmente para ser capaz de unirse a una región

de un primer exón; en vista de la identidad de una región de dicho primer y segundo exones, dicho oligonucleótido secundario también puede ser capaz de unirse a dicha región de dicho segundo exón. El diseño inverso es posible: un oligonucleótido de la invención puede diseñarse principalmente para ser capaz de unirse a una región de un segundo exón; en vista de la identidad de una región de dicho primer y segundo exones, dicho oligonucleótido secundario también puede ser capaz de unirse a dicha región de dicho primer exón.

El porcentaje de identidad entre una región del primer exón y una región del segundo exón, puede evaluarse en toda la región de dicho primer exón, en donde esa región puede ser más corta, más larga o igual de larga que la parte de esa región a la que es capaz de unirse el oligonucleótido de la invención. Como se emplea en esta memoria, la región del primer exón y la región del segundo exón, también pueden identificarse como la región o regiones de identidad. Preferiblemente, la región del primer exón que define la identidad con la región del segundo exón es igual de larga o más larga que la parte de esa región a la que puede unirse el oligonucleótido de la invención. Debe entenderse que el oligonucleótido de la invención puede ser capaz de unirse a una parte más pequeña, o a una parte parcialmente superpuesta, de dichas regiones utilizadas para evaluar la identidad de secuencia del primer y/o segundo exón. Por lo tanto, debe entenderse, que un oligonucleótido que puede unirse a una región de un primer y un segundo exón, puede unirse a una parte de dicha región de dicho primer exón y de dicho segundo exón. Dicha parte puede ser tan larga como dicha región de dicho primer y/o dicho segundo exón. Dicha parte puede ser más corta o más larga como dicha región de dicho primer y/o dicho segundo exón. Dicha parte puede estar comprendida dentro de dicha región de dicho primer y/o dicho segundo exón. Dicha parte puede solaparse con dicha región de dicho primer y/o dicho segundo exón. Esta superposición puede ser de 1, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos en el lado 5' y/o en el lado 3' de la región de dicho primer y/o segundo exón. El oligonucleótido puede tener una longitud de al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más nucleótidos o menor longitud que la región de dicho primer y/o dicho segundo exón y puede estar en el lado 5' o 3' de dicha región de la primera y/o segunda región.

La región, que tiene 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 o hasta 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos, usados para calcular el porcentaje de identidad entre un primer exón y un segundo exón, puede ser un tramo continuo o puede estar interrumpido por uno, dos, tres, cuatro o más huecos, siempre que el porcentaje de identidad en toda la región sea de al menos 50 %.

El porcentaje de identidad entre la región del primer exón y la región del segundo exón, puede evaluarse usando cualquier programa conocido por el experto en la técnica. Preferiblemente, dicha identidad se evalúa de la siguiente manera: el mejor alineamiento por pares entre el primer y el segundo exones usando la herramienta en línea EMBOSS Matcher usando ajustes predeterminados (Matriz: EDNAFULL, penalización por hueco: 16, penalización por extensión: 4).

Como se emplea en esta memoria, un oligonucleótido se refiere preferiblemente a un oligómero que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con, y/o es inversamente complementario a, una región o a una parte de una región de un primer y un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm.

Un oligonucleótido, como se identifica en la presente memoria (es decir, que puede unirse a una región de un primer exón y a una región de otro exón (es decir, un segundo exón) dentro del mismo pre-ARNm, en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón) también es preferiblemente al menos 80 % inversamente complementario a dicha región de dicho primer exón y al menos 45 % inversamente complementario a dicha región de dicho segundo exón. Más preferiblemente, dicho oligonucleótido es al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario inverso con respecto a dicha región de dicho primer exón y al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario inverso con respecto a dicha región de dicho segundo exón. La complementariedad inversa se evalúa preferiblemente, pero no necesariamente, en toda la longitud del oligonucleótido.

Un oligonucleótido incluido en la invención puede comprender al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos. Un oligonucleótido incluido en la invención puede comprender como máximo 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10 nucleótidos. La longitud del oligonucleótido de la invención se define por el número total de nucleótidos incluidos en dicho oligonucleótido, independientemente de cualquier modificación presente en dicho oligonucleótido. Como se expone más adelante, los nucleótidos pueden contener determinadas modificaciones químicas, pero dichos nucleótidos modificados todavía se consideran nucleótidos en el contexto de la presente invención. Dependiendo de las características químicas de un oligonucleótido, la longitud óptima de un oligonucleótido puede ser distinta. Por ejemplo, la longitud de un oligonucleótido 2'-O- metilfosforotioato puede ser de 15 a 30. Si este oligonucleótido se modifica adicionalmente como se ilustra en el la presente memoria, la longitud óptima puede acortarse a 14, 13 o incluso una longitud menor.

En una realización preferida, el oligonucleótido de la invención no tiene más de 30 nucleótidos, para limitar la posibilidad de reducir la eficiencia de la síntesis, el rendimiento, la pureza o escalabilidad, reducir la biodisponibilidad y/o la captación y el tránsito celular, reducir la seguridad y limitar el coste de bienes. En una realización más preferida, un oligonucleótido varía entre 15 y 25 nucleótidos. Lo más preferiblemente, un oligonucleótido incluido en la invención

- consiste en 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos. La longitud del oligonucleótido de la invención es preferiblemente tal que la funcionalidad o actividad del oligonucleótido se define induciendo al menos un 5 % de la omisión del primer y segundo exones (y cualquier exón o exones entre medias), o facilitando que se forme al menos el 5 % de una transcripción en marco, cuando se usa al menos 100 nM de dicho oligonucleótido para transfectar un cultivo celular relevante *in vitro*. La evaluación de la presencia de dicha transcripción ya se ha explicado en la presente memoria. Un cultivo celular relevante es un cultivo celular en donde el pre-ARNm que comprende dichos primer y dicho exones, se transcribe y se corta y empalma en un transcrito de ARNm. Si el pre-ARNm es el pre-ARNm de distrofina, un cultivo celular relevante comprende miocitos (diferenciados). En este caso, se forma al menos un 20 % de una transcripción en marco cuando se usa al menos 250 nM de dicho oligonucleótido.
- 5 Una región de un primer exón puede tener al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 o hasta 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos. Una región de un primer exón también se puede definir como que es al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la longitud de dicho exón.
- 10 Una región de un primer exón puede denominarse región de identidad.
- 15 Una región de un segundo exón puede tener al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80 o hasta 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos. Una región de un segundo exón se puede definir como que es al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la longitud de dicho exón. Una región de un segundo exón puede denominarse región de identidad.
- 20 En una realización, el oligonucleótido de la invención es capaz de unirse a una región de exón U+1 (primer exón) de un pre-ARNm, en donde una región de otro exón D-1 (segundo exón) dentro del mismo pre-ARNm tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho exón (U+1), en donde dicho oligonucleótido es para la omisión de dicho exón U+1 y dicho exón D-1 (y de uno o más exones adicionales preferiblemente localizados entre dicho primer y dicho segundo exones) de dicho pre-ARNm, para obtener una transcripción en marco en la que los exones U y D se cortan y empalman entre sí (por ejemplo, para DMD, preferiblemente como en la Tabla 1). Un oligonucleótido de la invención también se identifica en la presente memoria como un compuesto. Un oligonucleótido de la invención es preferiblemente un oligonucleótido antisentido (es decir, OAS). Un oligonucleótido es preferiblemente para omitir dichos dos exones (es decir, dicho primer exón (U+1) y dicho segundo exón (D-1)) de dicho pre-ARNm, y en donde el transcrito resultante (en el que U se corta y empalma directamente con D) es en marco (por ejemplo, para DMD preferiblemente como en la Tabla 1). Se puede decir que dicho oligonucleótido induce la omisión de dichos dos exones en un solo pre-ARNm. Opcionalmente, se induce la omisión de uno o más exones adicionales, en donde dicho exón o exones adicionales se localizan preferiblemente entre dicho primer y dicho segundo exones y la transcripción resultante está en marco.
- 25 Un oligonucleótido es más preferiblemente para la omisión de dichos dos exones (es decir, dicho primer y dicho segundo exones), y todo el tramo de exones entre medias de dicho primer y dicho segundo exones, en dicho pre-ARNm, para eliminar cualquier mutación dentro de dicho tramo, y para obtener una transcripción que sea más corta pero que tenga un marco abierto de lectura restablecido que permita la producción de proteínas.
- 30 Sin querer limitarse a ninguna teoría, se cree que debido a la identidad o similitud de secuencia de al menos 50 % entre dichos dos exones, un monooligonucleótido de la invención puede unirse e inducir la omisión de ambos exones, y, preferiblemente, de todo el tramo de exones entre medias para obtener una transcripción más corta, que está en marco. Por tanto, dichos dos exones pueden ser adyacentes en un pre-ARNm o pueden estar separados por al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 exones. La región que abarca uno o más exones presentes entre dichos primer y dicho segundo exones, también puede denominarse tramo de (múltiples) exones o tramo multiexónico. Preferiblemente, el primer exón de este tramo multiexónico es el primer exón identificado anteriormente en la presente memoria y el último exón de este tramo multiexónico es el segundo exón identificado anteriormente en la presente memoria. Un oligonucleótido de la invención también puede identificarse como un oligonucleótido que puede ser capaz de inducir la omisión de dichos dos exones o la omisión de un tramo de (múltiples) exones o la omisión de dicho tramo multiexónico. En una realización preferida, la omisión tanto del primer exón como del segundo exón, se induce usando un monooligonucleótido de la invención. En una realización preferida, la omisión de más de uno, más de 2, más de 3, más de 4, más de 5, más de 6, más de 7, más de 8, más de 9, más de 10, más de 11, más de 12, más de 13, más de 14, más de 15, más de 16, más de 17 exones, más de 18, más de 19, más de 20, más de 21, más de 22, más de 23, más de 24, más de 25, más de 26, más de 27, más de 28, más de 29, más de 30, más de 31, más de 32, más de 33, más de 34, más de 35, más de 36, más de 37, más de 38, más de 39, más de 40, más de 41, más de 42, más de 43, más de 44, más de 45, más de 46, más de 47, más de 48, más de 49, más de 50 exones, se lleva a cabo usando un monooligonucleótido y, por lo tanto, esta omisión de más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 exones, se lleva a cabo sin usar una mezcla o un cóctel de dos o más oligonucleótidos distintos, o sin usar dos o más oligonucleótidos distintos que pueden estar unidos con uno o más enlazadores, o sin usar una construcción génica que transcriba dos o más oligonucleótidos distintos. Por lo tanto, en una realización, se
- 35 40 45 50 55 60

proporciona que la invención incluya un monooligonucleótido y que no comprenda dos o más oligonucleótidos distintos, siendo dicho monooligonucleótido capaz de unirse a dichos primer y dicho segundo exones, y de inducir la omisión de al menos dichos primer y dicho segundo exones dentro de un solo pre-ARNm como se explica en la presente memoria. En este contexto, el experto en la técnica entiende que la palabra "sencilla" no se refiere al número de moléculas que se necesitan para inducir la omisión de exones. Sencilla se refiere a la secuencia de un oligonucleótido: la invención incluye una secuencia monooligonucleotídica y su uso y no comprende dos o más secuencias de oligonucleótidos distintas, siendo dicha secuencia monooligonucleotídica capaz de unirse a dicho primer y dicho segundo exones, y de inducir la omisión de al menos dicho primer y dicho segundo exones dentro de un solo pre-ARNm como se explica en la presente memoria. Esta es la primera invención que permite la omisión de más de un exón con un solo monooligonucleótido para tratar una enfermedad causada por una mutación (rara) en un gen, siempre que en dicho gen, diferentes exones comprendan regiones que tengan una identidad de secuencia de al menos 50 %.

Preferiblemente, un oligonucleótido de la invención se usa como una parte de la terapia basada en la actividad moduladora de ARN como se define más adelante en la presente memoria. Dependiendo de la identidad de la transcripción, en donde están presentes el primer y el segundo exones, se puede diseñar un oligonucleótido para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad determinada.

Se ha demostrado que el direccionamiento de dos exones dentro de un solo pre-ARNm con un monooligonucleótido capaz de unirse a ambos exones, da como resultado ARNm que carece de los exones diana y, de manera adicional, de todo el tramo de exones entre medias. Una ventaja de dicho monooligonucleótido, como se define en la presente memoria, es que pueden tratarse los defectos causados por diferentes mutaciones dentro de este tramo multiexónico. Si uno eligiese usar dos o más oligonucleótidos distintos para inducir la omisión de dos o más exones, se debería tener en cuenta, por ejemplo, que cada oligonucleótido puede tener su propio perfil farmacocinético (PK, *pharmacokinetic*) y que por tanto, habría que buscar condiciones en donde cada uno de ellos esté presente de manera similar en una misma célula. Por lo tanto, otra ventaja de usar uno solo monooligonucleótido capaz de unirse a dos exones diferentes, como se identificó anteriormente, es que la producción, la toxicidad, la búsqueda de dosis y las pruebas clínicas se facilitan enormemente ya que pueden reducirse a la producción y pruebas directas de un solo compuesto.

A continuación se definen características adicionales del oligonucleótido de la invención.

Dentro del contexto de la invención, en una realización preferida, un oligonucleótido es capaz de unirse a, dirigirse a, hibridarse con, es complementario inverso con y/o es capaz de inhibir la función de al menos una secuencia reguladora de corte y empalme dentro de al menos dicho primer exón y/o dicho segundo exón y/o está afectando a la estructura de al menos dicho primer exón y/o dicho segundo exón:

en donde dicho oligonucleótido comprende una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o es complementaria inversa con respecto a un sitio de unión para una proteína de serina-arginina (SR, *serine-arginine*) en dicho primer y/o segundo exones

y/o en donde dicho oligonucleótido es capaz de unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o es complementario inverso con respecto a un potenciador de corte y empalme exónico (ESE, siglas del inglés *exonic splicing enhancer*), una secuencia de reconocimiento de exones (ERS, siglas del inglés *exon recognition sequence*) y/o un silenciador de corte y empalme exónico (ESS, siglas del inglés *exonic splicing silencer*) en dicho primer y/o segundo exones.

Más preferiblemente, dicho oligonucleótido que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o que es complementario inverso con respecto a una región de un primer exón de pre-ARNm y/o a una región de un segundo exón de pre-ARNm es capaz de inhibir específicamente al menos una secuencia reguladora de corte y empalme y/o afectar a la estructura de al menos dicho primer y/o segundo exones en dicho pre-ARNm. La interferencia con dichas secuencias y/o estructuras reguladoras de corte y empalme tiene la ventaja de que dichos elementos se localizan dentro del exón.

Al proporcionar dicho oligonucleótido, como se define en la presente memoria, es posible ocultar eficazmente al menos dichos primer y segundo exones, y preferiblemente todo el tramo de exones entre medias, del mecanismo de corte y empalme. El hecho de que el mecanismo de corte empalme no reconozca estos exones, da lugar a la omisión o exclusión de estos exones del ARNm final. Esta realización se centra solo en secuencias codificantes. Se cree que esto permite que el método sea más específico y, por lo tanto, fiable. La complementariedad inversa de dicho oligonucleótido con respecto a dicha región de dicho primer y/o segundo exones de un pre-ARNm es preferiblemente de al menos 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un oligonucleótido antisentido para su uso como un medicamento para prevenir, retrasar, mejorar y/o tratar una enfermedad en un sujeto,

en donde dicho oligonucleótido es capaz de unirse a una región de un primer exón y una región de un segundo exón, en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón,

en donde dicho primer y dicho segundo exones están dentro de un mismo pre-ARNm en dicho sujeto, en donde dicha unión da como resultado la omisión de dicho primer exón y dicho segundo exón y preferiblemente la omisión de un tramo de múltiples exones que comienza con dicho primer exón e incluye uno o más exones presentes entre dicho primer y dicho segundo exones y como máximo la omisión de todo el tramo de exones entre dicho primer y dicho segundo exones, y

en donde se obtiene una transcripción en marco que permite la producción de una proteína funcional o semifuncional.

Preferiblemente, como se explica en la presente memoria, dicho oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de todo el tramo de exones entre dicho primer exón y dicho segundo exón.

5 Más preferiblemente, como se explica en la presente memoria, dicha unión de dicho oligonucleótido es capaz de interferir con al menos una secuencia reguladora de corte y empalme en dichas regiones de dichos primer y segundo exones y/o con la estructura secundaria de dichos primer y/o segundo exones y/o con la estructura secundaria que incluye al menos dicho primer y/o dicho segundo exones en dicho pre-ARNm. Las secuencias reguladoras de corte y empalme preferidas se presentan más adelante en la presente memoria.

10 Por lo tanto, una realización preferida se refiere a un oligonucleótido de la invención que puede unirse a una región de un primer exón de un pre-ARNm y/o a una región o a un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm, en donde dicha región de dicho segundo exón dentro del mismo pre-ARNm tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón (p. ej., para la DMD preferiblemente como en la Tabla 2), en donde dicho oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de dichos primer y segundo exones de dicho pre-ARNm; dando como resultado una transcripción que está en marco (p. ej., para la DMD preferiblemente como en la Tabla 1 o la Tabla 6). Dicho oligonucleótido proporciona a dicho individuo una proteína funcional o semifuncional, y dicho oligonucleótido comprende además:

- 15 - una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridación con, y/o que es complementaria inversa con respecto a una región de un primer y/o segundo exón de pre-ARNm que se hibrida con otra parte de un primer y/o segundo exón de pre-ARNm (estructura cerrada), y/o
- 20 - una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o que es complementaria inversa con respecto a una región de dicho primer y/o segundo exón de pre-ARNm que no se hibrida en dicho pre-ARNm (estructura abierta).

25 Para esta realización, se hace referencia a la solicitud de patente WO 2004/083446. Las moléculas de ARN exhiben estructuras secundarias fuertes, principalmente debido al emparejamiento de bases de tramos complementarios inversos o parcialmente complementarios inversos dentro del mismo ARN. Hace mucho tiempo se pensó que las estructuras en el ARN desempeñan un papel en la función del ARN. Sin quedar ligados a ninguna teoría, se cree que la estructura secundaria del ARN de un exón juega un papel en la estructuración del proceso de corte y empalme. A través de su estructura, un exón se reconoce como una parte que debe incluirse en el ARNm. En una realización, un oligonucleótido es capaz de interferir con la estructura de al menos dicho primer exón y probablemente también de dicho segundo exón y posiblemente también con el tramo de exones entre medias, y por lo tanto, capaz de interferir con el corte y empalme de dicho primer exón, y probablemente también de dicho segundo exón, y posiblemente también con el tramo de exones entre medias, ocultando dichos exones al mecanismo de corte y empalme y por lo tanto dando como resultado la omisión de dichos exones. Sin quedar ligados a ninguna teoría, se cree que la superposición con una estructura abierta mejora la eficacia de invasión de un oligonucleótido (es decir, aumenta la eficacia con la que el oligonucleótido puede entrar en la estructura), mientras que la superposición con la estructura cerrada aumenta posteriormente la eficacia de interferir con la estructura secundaria del ARN del exón. Se encuentra que la longitud de la complementariedad inversa parcial tanto para la estructura cerrada como para la abierta no está extremadamente restringida. Hemos observado altas eficacias con un oligonucleótido con longitudes variables de complementariedad inversa en cualquiera de las estructuras. La expresión complementariedad inversa se usa en la presente memoria para referirse a un tramo de ácidos nucleicos que, en condiciones fisiológicas, puede hibridarse con otro tramo de ácidos nucleicos. Las condiciones de hibridación se definen más adelante en la presente memoria. Por tanto, no es absolutamente necesario que todas las bases en la región de complementariedad inversa sean capaces de emparejarse con bases de la cadena opuesta. Por ejemplo, cuando se diseña un oligonucleótido, uno puede querer incorporar, por ejemplo, uno o más restos que no se emparejan con las bases en la cadena complementaria inversa. Hasta cierto punto se pueden permitir emparejamientos erróneos, si en las circunstancias en la célula, el tramo de nucleótidos todavía es capaz de hibridarse con la parte complementaria inversa. En el contexto de esta invención, se prefiere la presencia de un emparejamiento erróneo en el oligonucleótido de la invención ya que en una realización, dicho oligonucleótido es al menos 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 % complementario inverso con respecto a una región de un primer exón y/o a una región de un segundo exón. La presencia de un emparejamiento erróneo en dicho oligonucleótido es una característica preferida de la invención ya que dicho oligonucleótido puede unirse a una región de dicho primer exón y a una región de dicho segundo exón como se identificó anteriormente en la presente memoria.

55 En la presente memoria se definen otras ventajas de permitir la presencia de un emparejamiento erróneo en un oligonucleótido antisentido de la invención y son similares a las proporcionadas por la presencia de una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes: impedir la presencia de una CpG (citosina y guanina unidas por fosfato), impedir o disminuir una posible multimerización o agregación, impedir que se produzcan estructuras cuádruples, permitir diseñar un oligonucleótido con propiedades cinéticas de unión a ARN y/o termodinámicas mejoradas.

Preferiblemente, la complementariedad inversa del oligonucleótido con respecto a la región de identidad entre dicho primer y/o segundo exones es de 45 % a 65 %, de 50 % a 75 %, pero más preferiblemente es de 65 % a 100 % o de

70 % a 90 % o de 75 % a 85 % o de 80 % a 95 %. En general, esto permite 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 emparejamiento(s) erróneo(s) en un oligonucleótido de 20 nucleótidos. Por lo tanto, en un oligonucleótido de 40 nucleótidos puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 o 22 emparejamiento(s) erróneo(s). Preferiblemente, en un oligonucleótido de 40 nucleótidos hay menos de 14 emparejamientos erróneos. El número de emparejamientos erróneos es tal que un oligonucleótido de la invención todavía puede unirse a, hibridarse con, dirigirse a, una región de dicho primer exón y una región de dicho segundo exón, induciendo por lo tanto la omisión de al menos dicho primer y dicho segundo exones e induciendo la producción de una transcripción en marco como se explica en la presente memoria. Preferiblemente, la producción de una transcripción en marco se obtiene con una eficacia de al menos 5 % usando al menos 100 nM de dicho oligonucleótido para transfectar un cultivo celular relevante *in vitro* como se explicó anteriormente en la presente memoria.

Cabe señalar que la invención incluye un oligonucleótido que no tiene ningún emparejamiento erróneo con una región de un primer exón y que puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 o 22 emparejamiento(s) erróneo(s) con la región correspondiente de un segundo exón como se define en la presente memoria. Sin embargo, la invención también incluye un oligonucleótido que no tiene ningún emparejamiento erróneo con una región de un segundo exón y que puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 o 22 emparejamiento(s) erróneo(s) con la región correspondiente de un primer exón como se define en la presente memoria. Finalmente, la invención también incluye un oligonucleótido que puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21 o 22 emparejamiento(s) erróneo(s) con una región de un primer exón y que puede tener 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 emparejamientos erróneos con la región correspondiente de un segundo exón como se define en la presente memoria. En este caso de nuevo, debe entenderse que el número de emparejamientos erróneos en un oligonucleótido de la invención es tal que dicho oligonucleótido todavía puede unirse a, hibridarse con, dirigirse a, una región de dicho primer exón y una región de dicho segundo exón como se explica en la presente memoria.

Un oligonucleótido de la invención preferiblemente no atraviesa un hueco en el alineamiento de una región de un primer exón y de una región de un segundo exón como se identifica en la presente memoria. El alineamiento se lleva a cabo preferiblemente utilizando la herramienta en línea EMBOSS Matcher como se explicó anteriormente en este documento. Sin embargo, en casos específicos, puede ser necesario que un oligonucleótido de la invención atraviese un hueco, como se mencionó anteriormente en este documento. Preferiblemente dicho hueco es de tan solo un hueco. Preferiblemente dicho hueco abarca menos de 3 nucleótidos, lo más preferiblemente un solo nucleótido. El número y la longitud de los huecos son tales que un oligonucleótido de la invención todavía puede unirse a, hibridarse con, dirigirse a, una región de dicho primer exón y una región de dicho segundo exón, induciendo por lo tanto la omisión de al menos dicho primer y dicho segundo exones e induciendo la producción de una transcripción en marco como se explica en la presente memoria.

La estructura (es decir, estructuras abiertas y cerradas) se analiza mejor en el contexto del pre-ARNm en donde residen los exones. Dicha estructura puede analizarse en el ARN real. Sin embargo, actualmente es posible predecir la estructura secundaria de una molécula de ARN (con costes de energía más bajos) bastante bien utilizando programas de modelado de estructuras. Un ejemplo no limitativo de un programa adecuado es el servidor de internet Mfold (Zuker, M.).

Dada una secuencia de nucleótidos, un experto en la técnica podrá predecir, con reproducibilidad adecuada, una posible estructura de un exón. Las mejores predicciones se obtienen cuando se proporcionan dichos programas de modelado con dichas secuencias tanto exónicas como intrónicas flanqueantes. Normalmente, no es necesario modelar la estructura de todo el pre-ARNm.

El apareamiento de un oligonucleótido de la invención puede afectar al plegamiento local o a la estructura tridimensional (3D) o a la conformación del ARN diana (es decir, de la región que incluye al menos el primer y/o segundo exones). La conformación diferente puede dar como resultado la interrupción de una estructura reconocida por la maquinaria de corte empalme. Sin embargo, cuando dentro del primer y/o segundo exón diana se encuentran posibles secuencias (crípticas)ceptoras y/o donadoras de corte y empalme, ocasionalmente se genera una nueva estructura que define un (neo) exón diferente, es decir, con un extremo 5' diferente, un extremo 3' diferente, o ambos. Este tipo de actividad está dentro del alcance de la presente invención ya que el exón diana está excluido del ARNm. La presencia de un nuevo exón, que contiene parte de dicho primer y/o segundo exones diana, en el ARNm, no altera el hecho de que el exón diana, como tal, esté excluido. La inclusión de un neoexón puede verse como un efecto secundario que se produce solo ocasionalmente. Cuando para restablecer (parte de) un marco abierto de lectura de una transcripción que se interrumpe como resultado de una mutación, se usa la omisión de exones, hay dos posibilidades. Una es que el neoexón es funcional en el restablecimiento del marco de lectura, mientras que en el otro caso el marco de lectura no se restablece. Cuando se selecciona un oligonucleótido para restablecer un marco abierto de lectura por medio de la omisión de exones múltiple, por supuesto, está claro que en estas condiciones solo se seleccionan aquellos oligonucleótidos que de hecho dan lugar a la omisión de exones que restablece el marco abierto de lectura de una transcripción dada, con o sin un neoexón.

Además, en otra realización preferida, se proporciona un oligonucleótido de la invención que puede unirse a una región de un primer exón de un pre-ARNm y a una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm, en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón (las

regiones preferidas de los exones de distrofina se identifican en la Tabla 2 o en la Tabla 6), en donde dicho oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de dicho primer y segundo exones de dicho pre-ARNm; dando como resultado una transcripción que está en marco (para la DMD preferiblemente como en la Tabla 1 o la Tabla 6). Dicho oligonucleótido proporciona a dicho individuo una proteína funcional o semifuncional, y dicho oligonucleótido comprende además: una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con, es complementario inverso con respecto a, y/o puede inhibir la función de, uno o más sitios de unión de una proteína de serina-arginina (SR) en el ARN de un exón de un pre-ARNm.

En la solicitud de patente WO 2006/112705 se ha descrito la presencia de una correlación entre la eficacia de un oligonucleótido antisentido (OAS) interno de exón en la inducción de la omisión de exones y la presencia de un supuesto sitio de unión a SR en el sitio de pre-ARNm diana de dicho OAS. Por lo tanto, en una realización, se genera dicho oligonucleótido como se define en la presente memoria que comprende determinar uno o más (supuestos) sitios de unión de una proteína SR en el ARN de dicho primer y/o dicho exón y producir un oligonucleótido correspondiente que sea capaz de unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o sea complementario inverso con respecto a dicho ARN y que al menos se solape parcialmente con dicho (supuesto) sitio de unión. En la presente memoria, la expresión "se solapa al menos parcialmente" se define como que comprende un solapamiento de un solo nucleótido de un sitio de unión a SR, así como múltiples nucleótidos de uno o más dichos sitios de unión, así como un solapamiento completo de uno o más dichos sitios de unión. Preferiblemente, esta realización comprende además determinar, a partir de una estructura secundaria de un primer y/o segundo exón, una región que se hibride con otra parte de dicho primer y/o segundo exón (estructura cerrada) y una región que no se hibride en dicha estructura (estructura abierta), y generar posteriormente un oligonucleótido que se solape al menos parcialmente con uno o más (supuestos) sitios de unión y que se solape al menos con parte de dicha estructura cerrada y se solape al menos con parte de dicha estructura abierta y que se una a, se dirija a, se hibride con y/o que sea complementario inverso con respecto tanto al primer como al segundo exón. De esta manera, aumentamos la posibilidad de obtener un oligonucleótido que fuese capaz de interferir con la inclusión de dichos primer y segundo exones, y si corresponde, con todo el tramo de exones entre medias, del pre-ARNm en el ARNm. Sin querer limitarse a ninguna teoría, actualmente se piensa que el uso de un oligonucleótido dirigido a un sitio de unión a una proteína SR da como resultado (al menos en parte) el deterioro de la unión de una proteína SR con dicho sitio de unión que da como resultado el corte y empalme interrumpido o deteriorado.

Preferiblemente, una región de un primer exón y/o una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm de un oligonucleótido de la invención es capaz de unirse a, comprende una estructura abierta/cerrada y/o un sitio de unión a una proteína SR, más preferiblemente, dicha estructura abierta/cerrada y dicho sitio de unión a una proteína SR se solapan parcialmente e incluso más preferiblemente dicha estructura abierta/cerrada se solapa completamente con un sitio de unión a una proteína SR o un sitio de unión a una proteína SR se solapa completamente con una estructura abierta/cerrada. Esto permite una interrupción mejorada adicional de la inclusión de exones.

Además de secuencias consenso de sitios de corte y empalme, muchos exones (si no todos), contienen secuencias reguladoras de corte y empalme, tales como secuencias potenciadoras de corte y empalme exónico (ESE) para facilitar al espliceosoma el reconocimiento de sitios de corte y empalme genuinos (Cartegni L, et al. 2002; y Cartegni L, et al, 2003). Un subgrupo de factores de corte empalme, denominado proteínas SR, puede unirse a estas ESE y reclutar otros factores de corte y empalme, tales como U1 y U2AF en sitios de corte y empalme (poco definidos). Los sitios de unión de las cuatro proteínas SR más abundantes (SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55) se han analizado en detalle (Cartegni L, et al. 2002) y Cartegni L, et al, 2003). Existe una correlación entre la eficacia de un oligonucleótido y la presencia/ausencia de un sitio de unión de SF2/ASF, SC35, SRp40 y SRp55 en una parte de un primer exón unida por, hibridada con, y/o dirigida por, dicho oligonucleótido. En una realización preferida, la invención proporciona por tanto un oligonucleótido, que se une a, se hibrida con, se dirige a, y/o es complementario inverso con respecto a un sitio de unión para una proteína SR. Preferiblemente, dicha proteína SR es SF2/ASF o SC35, SRp40 o SRp55. En una realización, el oligonucleótido se une a, se hibrida con, se dirige a, y/o es complementario inverso con respecto a un sitio de unión para una proteína SF2/ASF, SC35, SRp40 o SRp55 en un primer exón y con respecto a un sitio de unión para una proteína SF2/ASF, SC35, SRp40 o SRp55 diferente en un segundo exón. En una realización más preferida, el oligonucleótido se une a, se hibrida con, se dirige a, y/o es complementario inverso con respecto a un sitio de unión para una proteína SF2/ASF, SC35, SRp40 o SRp55 en un primer exón y con respecto a un sitio de unión correspondiente para una proteína SF2/ASF, SC35, SRp40 o SRp55 similar en un segundo exón.

En una realización, a un paciente se le proporciona una proteína funcional o semifuncional usando un oligonucleótido que puede unirse a, dirigirse a, una secuencia reguladora de ARN presente en un primer y/o segundo exón que se requiere para el corte y empalme correcto de dicho(s) exón(es) en una transcripción. En una transcripción, para el correcto corte y empalme de exones, se requieren varias secuencias de ARN que actúen en cis. En particular, para regular el corte y empalme específico y eficaz de los exones constitutivos y alternativos, se identifican elementos complementarios, tales como potenciadores de corte y empalme exónico (ESE). Usando un compuesto que comprenda un oligonucleótido que se una, o que sea capaz de unirse, a uno de los elementos complementarios en dicho(s) primer y/o segundo exón(es), se altera su función reguladora para que se omitan los exones. Así pues, en una realización preferida, un oligonucleótido de la invención es capaz de unirse a una región de un primer exón de un pre-ARNm y a una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón, en donde dicho oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de dichos primer y segundo exones de dicho pre-ARNm; en donde dicha región de dicho

primer exón y/o dicha región de dicho segundo exón comprenden un potenciador de corte y empalme exónico (ESE), una secuencia de reconocimiento de exones (ERS) y/o una secuencia potenciadora de corte y empalme (SES) y/o en donde dicho oligonucleótido es capaz de unirse a, dirigirse a, es capaz de inhibir y/o es complementario inverso con respecto a dicho potenciador de corte y empalme exónico (ESE), una secuencia de reconocimiento de exones (ERS) y/o una secuencia potenciadora de corte y empalme (SES).

A continuación se describen las características químicas preferidas del oligonucleótido de la invención.

Un oligonucleótido se conoce comúnmente como un oligómero que tiene características de hibridación básicas similares a las de los ácidos nucleicos naturales. La hibridación se ha definido en la parte dedicada a las definiciones al final de la descripción de la invención. En esta solicitud, los términos oligonucleótido y oligómero se usan indistintamente. Para generar dicho oligonucleótido de la invención pueden usarse diferentes tipos de nucleósidos. Un oligonucleótido puede comprender al menos un enlace internucleosídico modificado y/o al menos una modificación de azúcar y/o al menos una modificación de bases, en comparación con un oligonucleótido basado en ribonucleótido o desoxirribonucleótido de origen natural.

Un "enlace internucleosídico modificado" indica la presencia de una versión modificada del fosfodiéster como se produce de manera natural en el ARN y ADN. Son ejemplos de modificaciones de enlaces internucleosídicos, que son compatibles con la presente invención, fosforotioato (PS), fosforotioato quiralmente puro, fosforditioato (PS2), fosfonoacetato (PACE), fosfonoacetamida (PACA), tiofosfonoacetato, tiofosfonoacetamida, profármaco de fosforotioato, H-fosfonato, metil fosfonato, metil fosfonotioato, metil fosfato, metil fosforotioato, etil fosfato, etil fosforotioato, boranofosfato, boranofosforotioato, metil boranofosfato, metil boranofosforotioato, metil boranofosfonato, metil boranofosfonotioato y sus derivados. Otra modificación incluye fosforamidita, fosforamidato, N3'→P5' fosforamidato, fosforodiamidato, fosforotioamidato, fosforotiodiamidato, sulfamato, dimetilsulfóxido, sulfonato, metilenimino (MMI), oxalilo y ácido tioacetamida nucleico (TANA); y sus derivados. Dependiendo de su longitud, un oligonucleótido de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 o 39 modificaciones de cadena principal. También se incluye en la invención, introducir más de una modificación de cadena principal distinta en dicho oligonucleótido.

También se incluye en la invención un oligonucleótido que comprende un enlace internucleosídico que puede ser diferente con respecto a los átomos de los nucleósidos que están conectados entre sí, en comparación con el enlace internucleosídico de origen natural. A este respecto, el oligonucleótido de la invención puede comprender al menos un enlace internucleosídico construido como monómeros ligados en 3'-3', 5'-5', 2'-3', 2'-5', 2'-2'. La numeración de las posiciones puede diferir de las de otras características químicas, pero la idea permanece dentro del alcance de la invención.

En una realización, el oligonucleótido de la invención comprende al menos una modificación con fosforotioato. En una realización más preferida, un oligonucleótido de la invención está completamente modificado con fosforotioato.

Una "modificación de azúcar" indica la presencia de una versión modificada del residuo de ribosilo como se produce de manera natural en el ARN y ADN (es decir, el residuo de furanosilo), tales como azúcares bicíclicos, tetrahidropiranos, morfolinos, azúcares modificados en 2', azúcares modificados en 3', azúcares modificados en 4', azúcares modificados en 5' y azúcares sustituidos en 4'. Como ejemplos de modificaciones de azúcar adecuadas se incluyen, pero sin limitación, restos de nucleótidos de ARN modificados en 2'-O, tales como 2'-O-alquilo o 2'-O-alquilo(sustituido), p. ej., 2'-O-metilo, 2'-O-(2-cianoetilo), 2'-O-(2-metoxi)etilo (2'-MOE), 2'-O-(2-tiometil)etilo, 2'-O-butirilo, 2'-O-propargilo, 2'-O-alilo, 2'-O-(2-amino)propilo, 2'-O-(2-(dimetilamino)propilo), 2'-O-(3-amino)propilo, 2'-O-(3-(dimetilamino)propilo), 2'-O-(2-amino)etilo, 2'-O-(3-guanidino)propilo (como se describe en la solicitud de patente WO 2013/061295, Universidad de Witwatersrand), 2'-O-(2-(dimetilamino)etilo); 2'-O-(haloalcoxi)metilo (Arai K. *et al.*) p. ej., 2'-O-(2'-cloroetoxi)metilo (MCEM), 2'-O-(2, 2-dicloroetoxi)metilo (DCEM); 2'-O-alcoxicarbonilo, p. ej., 2'-O-[2-(metoxycarbonil)etilo] (MOCE), 2'-O-[2-(A-metilcarbamoil)etilo] (MCE), 2'-O-[2-(N,N-dimetilcarbamoil)etilo] (DMCE); 2'-O-[metilaminocarbonil]metilo; 2'-azido; 2'-amino y amino 2'-sustituido; 2'-halo, p. ej., 2'-F, FANA (ácido 2'-F arabinosil nucleico); modificaciones de carb azúcar y aza azúcar; 3'-O-alquilo p. ej. 3'-O-metilo, 3'-O-butirilo, 3'-O-propargilo; 2', 3'-didesoxi; y sus derivados.

Otra modificación de azúcar incluye ácido nucleico "con puente" o "bicílico" (BNA, siglas del inglés *bridged o bicyclic nucleic acid*) modificado con residuos de azúcar, tales como los encontrados, p. ej., en el ácido nucleico bloqueado (LNA, siglas del inglés *locked nucleic acid*), xilo-LNA, α -L-LNA, β -D-LNA, cEt (2'-O, 4'-C etilo restringido) LNA, cMOEt (2'-O, 4'-C metoxietilo restringido) LNA, ácido etilen nucleico con puente (ENA, siglas del inglés *ethylene-bridged nucleic acid*), BNA^{NC}[N-Me] (como se describe en *Chem. Commun.* **2007**, 3765-3767 Kazuyuki Miyashita et al.), CRN como los descritos en la solicitud de patente WO 2013/036868 (Marina Biotech); ácido nucleico desbloqueado (UNA, siglas del inglés *unlocked nucleic acid*) u otros nucleósidos acíclicos como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2013/0130378 (Alnylam Pharmaceuticals); BNA sustituidos con 5'-metilo (como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 13/530 218); ácido ciclohexenil nucleico (CeNA), ácido altrial nucleico (ANA), ácido hexitol nucleico (HNA), HNA fluorado (F-HNA), piranosil-ARN (p-ARN), 3'-desoxipiranosil-ADN (p-ADN); u otros residuos de azúcar modificados, tales como morfolino (PMO), morfolino catiónico (PMOPlus), PMO-X; tricicloADN; triciclo-PS-ADN; y sus derivados. Por ejemplo, en el documento WO 2011/097641, se describen derivados de BNA. En el documento WO2011150408 se describen ejemplos de PMO-X.

Dependiendo de su longitud, un oligonucleótido de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 modificaciones de azúcar. También se incluye en la invención introducir más de una modificación de azúcar distinta en dicho oligonucleótido.

5 En una realización, el oligonucleótido según la invención comprende al menos una modificación de azúcar seleccionada de 2'-O-metilo, 2'-O-(2-metoxi)etilo, 2'-F, morfolino, un nucleótido con puente o BNA, o el oligonucleótido comprende nucleótidos con puente y nucleótidos 2'-desoxi (mezcla de oligómeros de BNA/ADN). Se ha demostrado que los oligonucleótidos que comprenden un nucleótido 2'-fluoro (2'-F) pueden reclutar el factor de unión al potenciador de interleucina 2 y 3 (ILF2/3) y, por lo tanto, pueden inducir la omisión de exones en el pre-ARNm diana (Rigo F, et al, WO2011/097614).

10 En otra realización, un oligonucleótido como se define en la presente memoria comprende o consiste en un LNA o un derivado del mismo. Más preferiblemente, el oligonucleótido según la invención se modifica en toda su longitud con una modificación de azúcar seleccionada de 2'-O-metilo, 2'-O-(2-metoxi)etilo, morfolino, ácido nucleico con puente o mezcla de oligómeros de BNA/ADN. En una realización más preferida, un oligonucleótido de la invención está completamente modificado con 2'-O-metilo.

15 En una realización preferida, el oligonucleótido de la invención comprende al menos una modificación de azúcar y al menos un enlace internucleosídico modificado. Dichas modificaciones incluyen ácido peptidonucleico (PNA, siglas del inglés *peptide-base nucleic acid*), PNA modificado con grupos de boro, ácido oxipéptido nucleico basado en pirrolidina (POPNA, siglas del inglés *pyrrolidine-based oxy-peptide nucleic acid*), ácido nucleico basado en glicol o glicerol (GNA, siglas del inglés *glycol/glycerol-based nucleic acid*), ácido nucleico basado en treosa (TNA, siglas del inglés *threose-based nucleic acid*), ácido nucleico acíclico basado en treoninol (aTNA, siglas del inglés *acyclic threoninol-based nucleic acid*), oligonucleótidos basados en morfolino (PMO, PPMO, PMO-X), oligómeros catiónicos basados en morfolino (PMOPlus, PMO-X), oligonucleótidos con bases y cadenas principales integradas (ONIB, siglas del inglés *oligonucleotides with integrated bases and backbones*), oligonucleótidos de pirrolidina y amida (POM, siglas del inglés *pyrrolidine-amide oligonucleotides*); y sus derivados. En una realización preferida, el oligonucleótido de la invención comprende una cadena principal de ácido peptidonucleico y/o una cadena principal de morfolino fosfordiamidato o un derivado del mismo. En una realización más preferida, el oligonucleótido según la invención es 2'-O-metilfosforotioato modificado, es decir, comprende al menos una modificación de 2'-O-metilfosforotioato, preferiblemente el oligonucleótido según la invención está totalmente modificado con 2'-O-metilfosforotioato. Preferiblemente, el oligonucleótido modificado con 2'-O-metilfosforotioato o el oligonucleótido totalmente modificado con 2'-O-metilfosforotioato es un oligonucleótido de ARN.

20 La expresión "modificación de bases" o "base modificada", como se identifica en la presente memoria, se refiere a la modificación de una base de origen natural en el ARN y/o ADN (es decir, bases de pirimidina o purina) o a bases sintetizadas *de novo*. Dicha base sintetizada *de novo* podría calificarse como "modificada" en comparación con una base existente.

25 Además de las modificaciones descritas anteriormente, el oligonucleótido de la invención puede comprender modificaciones adicionales, tales como diferentes tipos de restos de nucleótidos de ácido nucleico o nucleótidos como se describe a continuación. Para generar un oligonucleótido de la invención se pueden usar diferentes tipos de restos de nucleótidos de ácido nucleico. Dicho oligonucleótido puede tener al menos una modificación de la cadena principal y/o azúcar y/o al menos una modificación de bases en comparación con un oligonucleótido basado en ARN o ADN.

30 Un oligonucleótido puede comprender las bases naturales de purinas (adenina, guanina) o pirimidinas (citosina, timina, uracilo) y/o bases modificadas como se define más adelante. Dentro del contexto de la invención, un uracilo puede reemplazarse por una timina.

35 Una modificación de bases incluye una versión modificada de las bases naturales de purina y pirimidina (p. ej., adenina, uracilo, guanina, citosina y timina), tal como hipoxantina, ácido orótico, agmatidina, lisidina, seudouracilo, seudotimina, N1-metil seudouracilo, 2-tiopirimidina (p. ej., 2-tiouracilo, 2-tiotimina), 2, 6-diaminopurina, abrazadera G y sus derivados, pirimidina 5-sustituida (p. ej., 5-halouracilo, 5-metiluracilo, 5-metilcitosina, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-aminometiluracilo, 5-hidroximetiluracilo, 5-aminometilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, Super T), 5-octilpirimidina, 5-tiofenpirimidina, 5-octen-1-il-pirimidina, 5-etinilpirimidina, 5-(piridilamida), 5-isobutilo, 5-fenilo como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2013/0131141 (RXi); 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 7-aza-2, 6-diaminopurina, 8-aza-7-deazaguanina, 8-aza-7-deazaadenina, 8-aza-7-deaza-2, 6-diaminopurina, Super G, Super A y N4-etilcitosina, o sus derivados; N2-ciclopentilguanina (cPent-G), N2-ciclopentil-2-aminopurina (cPent-AP) y N2-propil-2-aminopurina (Pr-AP), o sus derivados; y bases degeneradas o universales, como 2, 6-difluorotolueno o bases ausentes como sitios abásicos (p. ej., 1-desoxirribosa, 1, 2-didesoxirribosa, 1-desoxi-2-O-metilribosa; o derivados de pirrolidina en los que el oxígeno del anillo se ha reemplazado por nitrógeno (azaribosa)). En la patente de Estados Unidos 6 683 173 (Epoch Biosciences) pueden encontrarse ejemplos de derivados de Super A, Super G y Super T. Se demostró que cPent-G, cPent-AP y Pr-AP reducen los efectos inmunoestimuladores cuando se incorporaban en ARNip (Peacock H. et al.), y se mostraron características similares para el seudouracilo y el N1-metilseudouracilo (solicitud de patente de Estados Unidos 2013/0123481, modeRNA Therapeutics).

La 'timina' y el '5-metiluracilo' pueden intercambiarse en todo el documento. Por analogía, la expresión '2, 6-diaminopurina' es idéntica a la expresión '2-aminoadenina' y ambas expresiones pueden intercambiarse a lo largo del documento.

5 En una realización preferida, el oligonucleótido de la invención comprende al menos una base de 5-metilcitosina y/o al menos una de 5-metiluracilo y/o al menos una de 2, 6-diaminopurina, por lo que debe entenderse que, al menos una de las nucleobases de citosina de dicho oligonucleótido, se ha modificado por la sustitución del protón en la posición 5 del anillo de pirimidina por un grupo metilo (es decir, una 5-metilcitosina), y/o que, al menos una de las nucleobases de uracilo de dicho oligonucleótido se ha modificado por la sustitución del protón en la posición 5 del anillo de pirimidina por un grupo metilo (es decir, un 5-metiluracilo), y/o que, al menos una de las nucleobases de adenina de dicho oligonucleótido se ha modificado por la sustitución del protón en la posición 2 por un grupo amino (es decir, una 2, 6-diaminopurina), respectivamente. Dentro del contexto de la invención, la expresión "la sustitución de un protón en la posición 5 del anillo de pirimidina por un grupo metilo" puede reemplazarse por la expresión "la sustitución de una pirimidina por una 5-metilpirimidina" refiriéndose pirimidina solo a uracilo, solo a citosina o a ambos. Del mismo modo, dentro del contexto de la invención, la expresión "la sustitución de un protón en la posición 2 de adenina por un grupo amino" puede reemplazarse por la expresión "la sustitución de una adenina por una 2, 6-diaminopurina". Si dicho oligonucleótido comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más citosinas, uracilos y/o adeninas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más citosinas, uracilos y/o adeninas, respectivamente, pueden haberse modificado de esta manera. En una realización preferida, todas las citosinas, todos los uracilos y/o todas las adeninas, se han modificado de esta manera o reemplazado por 5-metilcitosina, 5-metiluracilo y/o 2, 6-diaminopurina, respectivamente.

20 Se descubrió que la presencia de una 5-metilcitosina, un 5-metiluracilo y/o una 2, 6-diaminopurina en un oligonucleótido de la invención, tenía un efecto positivo en al menos uno de los parámetros o una mejora de al menos uno de los parámetros de dicho oligonucleótido. En este contexto, los parámetros pueden incluir: afinidad de unión y/o cinética, actividad silenciadora, bioestabilidad, distribución (intracelular), captación y/o tránsito celular y/o inmunogenicidad de dicho oligonucleótido, como se explica más adelante.

25 Como se sabe que varias de las modificaciones mencionadas anteriormente aumentan el valor de la Tf (temperatura de fusión) y, por lo tanto, mejoran la unión de un determinado nucleótido con su homólogo en su ARNm diana, estas modificaciones pueden explorarse para promover la unión de un oligonucleótido de la invención con una región tanto de un primer exón como de un segundo en el contexto de la invención. Dado que puede que las secuencias de un oligonucleótido de la invención no sean complementarias inversas al 100 % a una región dada de un primer exón y/o de un segundo exón, pueden implementarse modificaciones que aumenten la Tf, tales como un nucleótido con puente o BNA (tal como LNA) o una modificación de bases seleccionada de 5-metilpirimidinas y/o 2, 6-diaminopurina, preferiblemente en una posición de nucleótido que sea complementaria inversa a dicha primera y/o dicha segunda región de dichos exones.

35 La afinidad de unión y/o la cinética de unión o hibridación dependen de las propiedades termodinámicas de los OAS. Estas están determinadas, al menos en parte, por la temperatura de fusión de dicho oligonucleótido (Tf; calculada, p. ej., con la calculadora de propiedades de oligonucleótidos (<http://www.unc.edu/~cail/biotool/oligo/index.html> o <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) para ARN monocatenario usando la Tf básica y el modelo del vecino más cercano), y/o la energía libre del complejo oligonucleótido-exón diana (usando la estructura de ARN, versión 4.5 o el programa Mfold para ARN, versión 3.5). Si se aumenta una Tf, la actividad de omisión de exones normalmente aumenta, pero cuando una Tf es demasiado alta, se espera que el OAS sea menos específico de secuencia. Una Tf y energía libre aceptables dependen de la secuencia del oligonucleótido. Por lo tanto, es difícil dar intervalos preferidos a cada uno de estos parámetros.

Una actividad de un oligonucleótido de la invención se define preferiblemente de la siguiente manera:

- 45 - aliviar uno o más síntomas de una enfermedad asociada a una mutación presente en un primer y/o en un segundo exón y/o a mutación presente dentro del tramo que comienza en dicho primer exón y termina en dicho segundo exón, preferiblemente aliviando uno o más síntomas de DMD o BMD; y/o
- aliviando una o más características de una célula de un paciente, preferiblemente un miocito de un paciente; y/o
- proporcionando a dicho individuo una proteína funcional o semifuncional, preferiblemente una proteína de distrofina funcional o semifuncional; y/o
- 50 - al menos en parte disminuyendo en un individuo la producción de una proteína aberrante, preferiblemente disminuyendo al menos en parte en dicho individuo la producción de una proteína de distrofina aberrante. En la presente memoria, cada una de estas características y ensayos para evaluarlas, se han definido más adelante.

Se espera que un oligonucleótido preferido de la invención, que comprende una base de 5-metilcitosina y/o 5-metiluracilo y/o 2,6-diaminopurina, muestre una actividad aumentada en comparación con la actividad correspondiente de un oligonucleótido que no tenga ninguna base de 5-metilcitosina, 5-metiluracilo y 2,6-diaminopurina. Esta diferencia en términos de actividad puede ser de al menos 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %. La biodistribución y la bioestabilidad se determinan preferiblemente al menos en parte mediante un ensayo de ligamiento de hibridación validado adaptado de Yu et al.,

2002. En una realización, se incuban muestras de plasma o tejido homogeneizado con una sonda de oligonucleótidos de captura específica. Después de la separación, un oligonucleótido marcado con DIG se liga al complejo y se sigue la detección usando una peroxidasa unida a anticuerpo anti-DIG. El análisis farmacocinético no compartimental se realiza utilizando el paquete del programa informático WINNONLIN (modelo 200, versión 5.2, Pharsight, Mountainview, CA). Los niveles de OAS (μg) por ml de plasma o mg de tejido se controlan con el tiempo para evaluar el área bajo la curva (ABC), la concentración máxima ($C_{\text{máx}}$), el tiempo hasta la concentración máxima ($T_{\text{máx}}$), la semivida terminal y el periodo de latencia (t_{lag} , *lag time*) de absorción. Dicho ensayo preferido se ha descrito en la parte experimental. Un oligonucleótido puede estimular una respuesta inmunitaria innata activando los receptores tipo Toll (TLR, *Toll-like receptors*), incluyendo TLR9 y TLR7 (Krieg AM, et al., 1995). Normalmente, la activación de TLR9 se produce debido a la presencia de secuencias CG no metiladas presentes en oligodesoxinucleótidos (ODN), imitando el ADN bacteriano que activa el sistema inmunitario innato a través de la liberación de citocinas mediada por TLR9. Sin embargo, la modificación 2'-O-metilo puede reducir notablemente dicho posible efecto. Se ha descrito que TLR7 reconoce repeticiones de uracilo en ARN (Diebold SS, et al., 2006).

La activación de TLR9 y TLR7 da como resultado un conjunto de respuestas inmunitarias coordinadas que incluyen inmunidad innata (macrófagos, células dendríticas (CD) y linfocitos citolíticos naturales (*natural killer cells* o *NK cells*)) (Krieg AM, et al., 1995; Krieg A.M., et al. 2000). Varias quimiocinas y citocinas, tales como IP-10, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, MCP-1 e IFN α (Wagner H., et al, 1999; Popovic P.J., et al., 2006) se han implicado en este proceso. Las citocinas inflamatorias atraen a células defensivas adicionales de la sangre, tales como linfocitos T y B. Los niveles de estas citocinas pueden investigarse mediante ensayos *in vitro*. En resumen, sangre entera humana se incubaba con concentraciones en aumento de oligonucleótidos, después de lo cual se determinan los niveles de las citocinas utilizando kits estándar de ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*) disponibles en el comercio. Una disminución en la inmunogenicidad corresponde preferiblemente a una disminución detectable de la concentración de al menos una de las citocinas mencionadas anteriormente en comparación con la concentración de la citocina correspondiente en un ensayo en una célula tratada con un oligonucleótido que comprende al menos una 5-metilcitosina y/o 5-metiluracilo y/o 2, 6-diaminopurina en comparación con una célula tratada con un oligonucleótido correspondiente que no tiene 5-metilcitosinas, 5-metiluracilos o 2, 6-diaminopurinas.

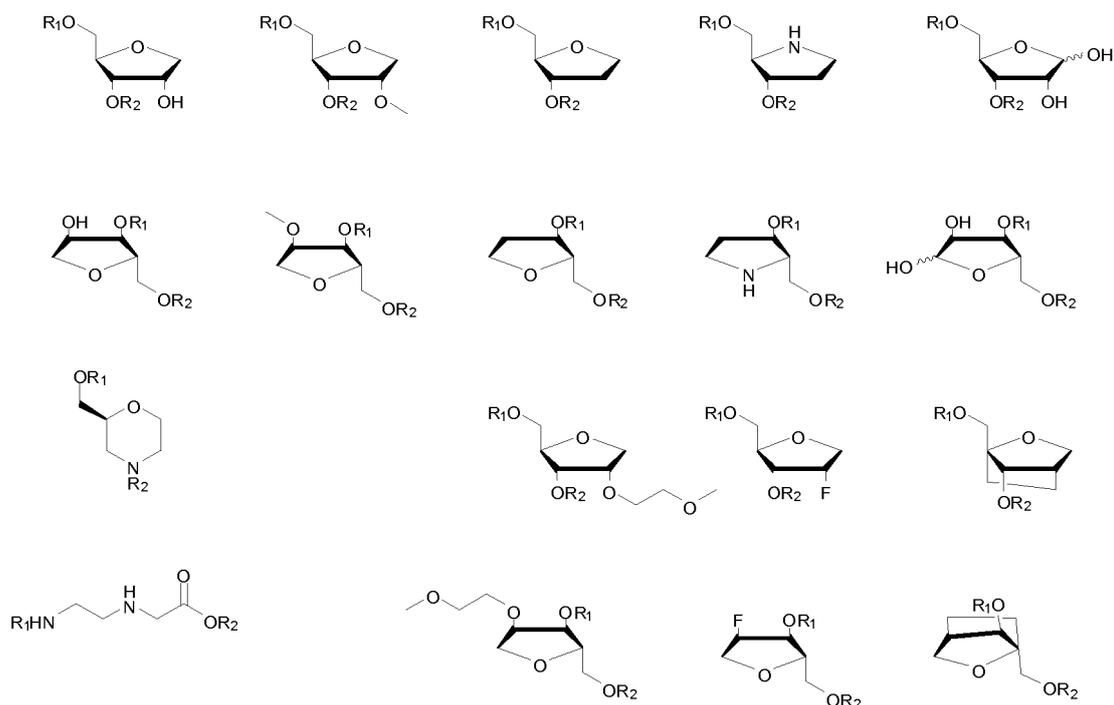
Por consiguiente, un oligonucleótido preferido de la invención tiene un parámetro mejorado, tal como una inmunogenicidad aceptable o disminuida y/o una mejor biodistribución y/o propiedades cinéticas de unión a ARN y/o termodinámicas mejoradas o aceptables en comparación con un oligonucleótido correspondiente sin una 5-metilcitosina, sin un 5-metiluracilo y sin una 2, 6-diaminopurina. Cada uno de estos parámetros podría evaluarse utilizando ensayos conocidos por el experto en la técnica.

Un oligonucleótido preferido de la invención comprende o consiste en una molécula de ARN o una molécula de ARN modificada. En una realización preferida, un oligonucleótido es monocatenario. Sin embargo, el experto en la técnica comprenderá que es posible que un oligonucleótido monocatenario pueda formar una estructura bicatenaria interna. Sin embargo, en el contexto de esta invención, a este oligonucleótido se le sigue denominando oligonucleótido monocatenario. Un oligonucleótido monocatenario tiene varias ventajas en comparación con un oligonucleótido ARNip bicatenario: (i) se espera que su síntesis sea más fácil que la de dos cadenas complementarias de ARNip; (ii) existe un intervalo más amplio de posibles modificaciones químicas para mejorar la absorción en las células, una mejor estabilidad (fisiológica) y los posibles efectos adversos genéricos disminuyen; (iii) los ARNip tienen un mayor potencial de efectos no específicos (incluyendo genes inespecíficos) y una farmacología exagerada (p. ej., menos posible control de eficacia y selectividad por programa de tratamiento o dosis) y (iv) los ARNip son menos propensos a actuar en el núcleo y no pueden dirigirse contra intrones.

En otra realización, un oligonucleótido de la invención comprende un sitio abásico o un monómero abásico. Dentro del contexto de la invención, dicho monómero puede denominarse sitio abásico o monómero abásico. Un monómero abásico es un resto de nucleótido o bloque de construcción que carece de una nucleobase en comparación con un resto de nucleótido correspondiente que comprende una nucleobase. Dentro de la invención, un monómero abásico es, por tanto, una parte de un bloque de construcción de un oligonucleótido pero que carece de una nucleobase. Dicho monómero abásico puede estar presente o ligado o conectado o conjugado a un extremo libre de un oligonucleótido.

En una realización más preferida, un oligonucleótido de la invención comprende 1-10 o más monómeros abásicos. Por lo tanto, en un oligonucleótido de la invención puede haber 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más monómeros abásicos.

Un monómero abásico puede ser de cualquier tipo conocido y concebible por el experto en la técnica, cuyos ejemplos no limitativos se representan a continuación:



En la presente memoria, R₁ y R₂ son independientemente H, un oligonucleótido u otro sitio o sitios abásicos, siempre y cuando ni tanto R₁ como R₂ sean H y ni tanto R₁ como R₂ sean un oligonucleótido. Como se especificó anteriormente, uno o más monómeros abásicos pueden estar conectados a cualquier extremo o a ambos extremos del oligonucleótido. Debe observarse que un oligonucleótido conectado a uno o a dos sitios abásicos o a uno o más monómeros abásicos, puede comprender menos de 10 nucleótidos. A este respecto, el oligonucleótido según la invención puede comprender al menos 10 nucleótidos, opcionalmente incluyendo uno o más sitios abásicos o monómeros abásicos en uno o ambos extremos. En la solicitud de patente de Estados Unidos 2013/013378 (Alnylam Pharmaceuticals) se describen otros ejemplos de sitios abásicos que están incluidos en la invención.

Dependiendo de su longitud, un oligonucleótido de la invención puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 modificaciones de bases. En la invención también se incluye la introducción de más de una modificación de bases distinta en dicho oligonucleótido.

Por tanto, en una realización, el oligonucleótido según la invención comprende:

- (a) al menos una modificación de bases seleccionada de 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, timina, 2, 6-diaminopurina; y/o
- (b) al menos una modificación de azúcar seleccionada de 2'-O-metilo, 2'-O-(2-metoxi)etilo, 2'-O-desoxi (ADN), 2'-F, morfolino, un nucleótido con puente o BNA, o el oligonucleótido comprende nucleótidos con puente y nucleótidos 2'-desoxi modificados (mezcla de oligómeros de BNA/ADN); y/o
- (c) al menos una modificación de la cadena principal seleccionada de fosforotioato o fosforodiamidato.

En otra realización, el oligonucleótido según la invención comprende:

- (a) al menos una modificación de bases seleccionada de 5-metilpirimidina y 2, 6-diaminopurina; y/o
- (b) al menos una modificación de azúcar, que es 2'-O-metilo; y/o
- (c) al menos una modificación de la cadena principal, que es de fosforotioato.

En una realización, un oligonucleótido de la invención comprende al menos una modificación en comparación con un oligonucleótido basado en ribonucleótido o desoxirribonucleótido de origen natural, más preferiblemente

- (a) al menos una modificación de bases, preferiblemente seleccionada de 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, timina, 2, 6-diaminopurina, más preferiblemente seleccionada de 5-metilpirimidina y 2, 6-diaminopurina; y/o

30

(b) al menos una modificación de azúcar, preferiblemente seleccionada de 2'-O-metilo, 2'-O-(2-metoxi)etilo, 2'-O-desoxi (ADN), 2'-F, morfolino, un nucleótido con puente o BNA, o el oligonucleótido comprende nucleótidos con puente y nucleótidos 2'-desoxi modificados (mezcla de oligómeros de BNA/ADN), más preferiblemente la modificación de azúcar es 2'-O-metilo; y/o

5 (c) al menos una modificación de la cadena principal, preferiblemente seleccionada de fosforotioato o fosforodiamidato, más preferiblemente, la modificación de la cadena principal es de fosforotioato.

Por tanto, un oligonucleótido según esta realización de la invención comprende una modificación de bases (a) y ninguna modificación de azúcar (b) y ninguna modificación de la cadena principal (c). Otro oligonucleótido preferido según este aspecto de la invención, comprende una modificación de azúcar (b) y ninguna modificación de bases (a) y ninguna modificación de la cadena principal (c). Otro oligonucleótido preferido según este aspecto de la invención, comprende una modificación de la cadena principal (c) y ninguna modificación de bases (a) y ninguna modificación de azúcar (b). También se entiende que los oligonucleótidos que no tienen ninguna de las modificaciones mencionadas anteriormente están cubiertos por la presente invención, así como los oligonucleótidos que comprenden dos modificaciones, es decir (a) y (b), (a) y (c) y/o (b) y (c), o las tres modificaciones (a), (b) y (c), como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, el oligonucleótido según la invención se modifica en toda su longitud con una o más de la misma modificación, seleccionada de (a) una de las modificaciones de bases; y/o (b) una de las modificaciones de azúcar; y/o (c) una de las modificaciones de la cadena principal.

20 Con la llegada de la tecnología de imitación de ácido nucleico, ha sido posible generar moléculas que tienen características similares, preferiblemente las mismas características de hibridación en especie, no necesariamente en cantidad, que las del propio ácido nucleico. Dichos equivalentes funcionales también son, por supuesto, adecuados para su uso en la invención.

En otra realización preferida, un oligonucleótido comprende una inosina, una hipoxantina, una base universal, una base degenerada y/o un nucleósido o nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes o uno de sus equivalentes funcionales. El uso de una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, es muy atractivo como se explica a continuación. La inosina, por ejemplo, es una base modificada conocida, que puede emparejarse con tres bases: uracilo, adenina y citosina. La inosina es un nucleósido que se forma cuando la hipoxantina se conecta a un anillo de ribosa (también conocido como ribofuranosa) a través de un enlace β [beta]-N9-glucosídico. La inosina (I) se encuentra comúnmente en los ARNt y es esencial para la correcta traducción del código genético en pares de bases oscilantes. Entre la G y el U, o entre la I en un lado y el U, la A o la C en el otro lado, puede haber un par de bases oscilantes. Estas son fundamentales en la formación de la estructura secundaria de ARN. Su estabilidad termodinámica es comparable a la del par de bases de Watson y Crick. El código genético compensa las disparidades en el número de aminoácidos (20) para tripletes codónicos (64), usando pares de bases modificadas en la primera base del codón opuesto.

Una primera ventaja de usar una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, permite diseñar un oligonucleótido que puede unirse a una región de un primer exón de un pre-ARNm y es capaz de unirse a una región de un segundo exón dentro del mismo pre-ARNm, en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón. En otras palabras, la presencia de una inosina (hipoxantina) y/o de una base universal y/o de una base degenerada y/o de un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, permite la unión de dicho oligonucleótido a una región de un primer exón y a una región de un segundo exón de dicho pre-ARNm.

45 Una segunda ventaja de usar una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, permite diseñar un oligonucleótido que abarque un polimorfismo mononucleotídico (SNP, *single nucleotide polymorphism*), sin preocuparse de que el polimorfismo altere la eficacia de apareamiento del oligonucleótido. Por lo tanto, en la invención, el uso de dicha base permite diseñar un oligonucleótido que pueda usarse para un individuo que tiene un SNP dentro del tramo del pre-ARNm al que se dirige un oligonucleótido de la invención.

50 Una tercera ventaja de usar una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, es cuando dicho oligonucleótido contenga normalmente una CpG al haberse diseñado como complementario a una parte de un primer exón de pre-ARNm como se identifica en este documento. La presencia de una CpG en un oligonucleótido se asocia generalmente con una inmunogenicidad aumentada de dicho oligonucleótido (Dorn A. y Kippenberger S.). Este aumento de inmunogenicidad no se desea, ya que puede inducir la rotura de fibras musculares. Reemplazando la guanina por una inosina en una, dos o más CpG, se espera que a dicho oligonucleótido se le proporcione un nivel de inmunogenicidad disminuido y/o aceptable. La inmunogenicidad se puede evaluar en un modelo animal evaluando la presencia de células CD4⁺ y/o CD8⁺ y/o la infiltración de mononucleocitos inflamatorios en una biopsia de músculo de dicho animal. La inmunogenicidad también se puede evaluar en la sangre de un animal

o de un ser humano que está tratándose con un oligonucleótido de la invención detectando la presencia de un anticuerpo neutralizante y/o de un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido usando un inmunoensayo estándar conocido para el experto en la técnica. Un aumento en la inmunogenicidad corresponde preferiblemente a un aumento detectable de al menos uno de estos tipos de células en comparación con la cantidad de cada tipo de célula en una biopsia de músculo correspondiente de un animal antes del tratamiento o tratado con un oligonucleótido correspondiente que tiene al menos una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes. Como alternativa, se puede evaluar un aumento en la inmunogenicidad detectando la presencia o una cantidad en aumento de un anticuerpo neutralizante o de un anticuerpo que reconoce dicho oligonucleótido, usando un inmunoensayo estándar. Una disminución en la inmunogenicidad corresponde preferiblemente a una disminución detectable de al menos uno de estos tipos de células en comparación con la cantidad de tipo de célula correspondiente en una biopsia de músculo correspondiente de un animal antes del tratamiento o tratado con un oligonucleótido correspondiente que no tiene inosina (hipoxantina) y/o base universal y/o base degenerada y/o nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes. Como alternativa, una disminución en la inmunogenicidad puede evaluarse por la ausencia de, o una cantidad decreciente de, dicho compuesto y/o anticuerpos neutralizantes, usando un inmunoensayo estándar.

Una cuarta ventaja de usar una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, es impedir o disminuir una posible multimerización o agregación de oligonucleótidos. Por ejemplo, se sabe que un oligonucleótido que comprende un motivo de cuarteto de G tiene tendencia a formar un cuádruple, un multímero o agregado formado por el emparejamiento de bases de Hoogsteen de cuatro oligonucleótidos monocatenarios (Cheng A.J. y Van Dyke M.W.), que, por supuesto, no se desea: como resultado, se espera que disminuya la eficacia del oligonucleótido. La multimerización o agregación se evalúa preferiblemente mediante técnicas estándar de electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizante conocidas para el experto en la técnica. En una realización preferida, menos del 20 % o 15 %, 10 %, 7 %, 5 % o menos de una cantidad total de un oligonucleótido de la invención tiene la capacidad de multimerizarse o agregarse, evaluado usando el ensayo mencionado anteriormente.

Una quinta ventaja de usar una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, es por tanto impedir también estructuras cuádruples que se han asociado a actividad antitrombótica (Macaya RF, et al.) así como a la unión al receptor del captador de macrófagos y a su inhibición (Suzuki K., et al.).

Una sexta ventaja de usar una inosina (hipoxantina) y/o una base universal y/o una base degenerada y/o un nucleótido que contiene una base capaz de formar un par de bases oscilantes en un oligonucleótido de la invención, es permitir diseñar un oligonucleótido con propiedades cinéticas de unión a ARN y/o termodinámicas mejoradas. Las propiedades cinéticas de unión a ARN y/o termodinámicas están determinadas, al menos en parte, por la temperatura de fusión de un oligonucleótido (T_f ; calculada con la calculadora de propiedades de oligonucleótidos (<http://www.unc.edu/~cail/bioutil/oligo/index.html>) para ARN monocatenario, utilizando la T_f básica y el modelo del vecino más próximo), y/o la energía libre del complejo OAS-exón diana (usando la estructura de ARN versión 4.5). Si una T_f es demasiado alta, se espera que el oligonucleótido sea menos específico. Una T_f y energía libre aceptables dependen de la secuencia del oligonucleótido. Por lo tanto, es difícil dar intervalos preferidos a cada uno de estos parámetros. Una T_f aceptable puede variar entre 35 y 85 °C y una energía libre aceptable puede variar entre 15 y 45 kcal/mol.

Dependiendo de su longitud, un oligonucleótido de la presente invención puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 inosinas (hipoxantina) y/o bases universales y/o bases degeneradas y/o nucleótidos que contienen una base capaz de formar un par de bases oscilantes o uno de sus equivalentes funcionales.

Preferiblemente, dicho oligonucleótido de la invención comprende ARN, en forma de dúplex de ARN/ARN que son muy estables. Se prefiere que un oligonucleótido de ARN comprenda una modificación que proporcione al ARN una propiedad adicional, por ejemplo, resistencia a endonucleasas, exonucleasas y RNasaH, fuerza de hibridación adicional, mayor estabilidad (por ejemplo, en un líquido corporal), mayor o menor flexibilidad, toxicidad reducida, mayor transporte intracelular, especificidad tisular, etc. Las modificaciones preferidas se han identificado anteriormente.

Por tanto, una realización proporciona un oligonucleótido que comprende al menos una modificación. Un oligonucleótido modificado preferido es 2'-O-metilo modificado por completo. En una realización de la invención, un oligonucleótido comprende o consiste en un oligonucleótido híbrido que comprende una modificación de oligoribonucleótido 2'-O-metilfosforotioato y una modificación de ácido nucleico con puente (BNA, como se ilustró anteriormente). En otra realización de la invención, un oligonucleótido comprende o consiste en un oligonucleótido híbrido que comprende una modificación 2'-O-metoxietilfosforotioato y un ácido nucleico con puente (BNA, como se ilustró anteriormente). En otra realización de la invención, un oligonucleótido comprende o consiste en un oligonucleótido híbrido que comprende una modificación de ácido nucleico con puente (BNA, como se ilustró anteriormente) y una modificación de oligodesoxirribonucleótido. Esta combinación particular comprende una mejor especificidad de secuencia en comparación con un equivalente que consiste solo en ácido nucleico con puente, y comprende una eficacia mejorada cuando se compara con un oligonucleótido que consiste en la modificación de oligo(desoxi)ribonucleótido 2'-O-metilfosforotioato.

El compuesto como se describe en la invención puede poseer preferiblemente grupos ionizables. Los grupos ionizables pueden ser bases o ácidos, y pueden estar cargados o ser neutros. Los grupos ionizables pueden estar presentes como un par de iones con un contraión apropiado que lleva carga(s) opuesta(s). Son ejemplos de contraiones catiónicos, el sodio, potasio, cesio, Tris, litio, calcio, magnesio, trietilamonio, trietilamonio y tetraalquilamonio. Son ejemplos de contraiones aniónicos, el cloruro, bromuro, yoduro, lactato, mesilato, acetato, trifluoroacetato, dicloroacetato y citrato. Se han descrito ejemplos de contraiones (p. ej., Kumar L.). En la solicitud de patente de Estados Unidos 2012046348 (Replicor), se han descrito ejemplos de aplicaciones de contraiones di o trivalentes, especialmente Ca^{2+} , que añaden características positivas a oligonucleótidos seleccionados. Los contraiones divalentes o trivalentes preferidos se seleccionan de la siguiente lista o grupo: calcio, magnesio, cobalto, hierro, manganeso, bario, níquel, cobre y zinc. Un contraión divalente preferido es el calcio. Por lo tanto, en la presente invención se incluye, preparar, obtener y usar una composición que comprenda un oligonucleótido de la invención y cualquier otro contraión identificado anteriormente, preferiblemente calcio. Dicho método para la preparación de dicha composición que comprende dicho oligonucleótido y dicho contraión, preferiblemente calcio, puede ser el siguiente: un oligonucleótido de la invención puede disolverse en un excipiente acuoso farmacéuticamente aceptable, y gradualmente, al oligonucleótido disuelto se le añade una solución que comprende dicho contraión, de manera que el complejo de quelato de oligonucleótido permanezca soluble.

Por lo tanto, en una realización preferida, un oligonucleótido de la invención se ha puesto en contacto con una composición que comprende dicho contraión, preferiblemente Ca^{2+} , para formar un complejo de quelato de oligonucleótido que comprenda dos o más oligonucleótidos idénticos ligados por dicho contraión como se identifica en la presente memoria. Por lo tanto, en la invención se incluye una composición que comprende un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende dos o más oligonucleótidos idénticos ligados por un contraión, preferiblemente calcio.

Método para diseñar un oligonucleótido

Por consiguiente, en un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para diseñar un oligonucleótido en donde dicho método da lugar a un oligonucleótido como se identificó anteriormente.

Este método comprende las siguientes etapas:

- (a) identificar una combinación en marco de un primer y un segundo exón en un mismo pre-ARNm, en donde una región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con una región de dicho primer exón;
- (b) diseñar un oligonucleótido que sea capaz de unirse a dicha región de dicho primer exón y a dicha región de dicho segundo exón,
- (c) en donde dicha unión da como resultado la omisión de dicho primer exón y dicho segundo exón, preferiblemente la omisión de un tramo multiexónico que comienza con dicho primer exón y abarca uno o más exones presentes entre dicho primer y dicho segundo exones y como máximo la omisión de todo el tramo de exones entre dicho primer y dicho segundo exones, y
- (d) en donde dicho método da lugar a un oligonucleótido

En la etapa b) de dicho método, dicho oligonucleótido se diseña preferiblemente de modo que su unión interfiera con al menos una secuencia reguladora de corte y empalme en dichas regiones de dicho primer y/o segundo exones en dicho pre-ARNm.

Como alternativa o en combinación con la interferencia de una secuencia reguladora de corte y empalme, la unión de dicho oligonucleótido interfiere preferiblemente con la estructura secundaria que abarca al menos dicho primer y/o dicho segundo exones en dicho pre-ARNm.

El oligonucleótido obtenible mediante este método puede inducir la omisión de dichos primer y segundo exones de dicho pre-ARNm. Preferiblemente se induce la omisión de uno o más exones adicionales, en donde dicho uno o más exones adicionales se localizan preferiblemente entre dicho primer y dicho segundo exones, y en donde la transcripción de ARNm resultante está en marco. El oligonucleótido es preferiblemente capaz de inducir la omisión de todo el tramo de exones entre dicho primer exón y dicho segundo exón. En una realización, dichas regiones de dicho primer exón y dicho segundo exón comprenden un elemento regulador de corte y empalme, de modo que la unión de dicho oligonucleótido es capaz de interferir con al menos una secuencia reguladora de corte y empalme en dichas regiones de dichos primer y segundo exones. También se incluye que la unión de dicho oligonucleótido interfiera con la estructura secundaria que abarca al menos dicho primer y/o dicho segundo exones en dicho pre-ARNm. La secuencia reguladora de corte y empalme preferida comprende un sitio de unión para una proteína de serina-arginina (SR), un potenciador de corte y empalme exónico (ESE, siglas del inglés *exonic splicing enhancer*), una secuencia de reconocimiento de exones (ERS) y/o un silenciador de corte y empalme exónico (ESS).

En la presente memoria, cada característica de este método ya se ha definido o es conocida para el experto en la técnica.

Oligonucleótidos preferidos

Preferiblemente, un oligonucleótido de la invención es para su uso como medicamento, más preferiblemente dicho compuesto es para su uso en terapias moduladoras de ARN. Más preferiblemente, dicha modulación de ARN conduce a la corrección de un marco de lectura transcripcional alterado y/o al restablecimiento de la expresión de una proteína deseada o esperada. por tanto, en principio, el método de la invención y el oligonucleótido de la invención pueden aplicarse a cualquier enfermedad relacionada con la presencia de una mutación que altere el marco, que conduce a una transcripción aberrante y/o a la ausencia de una proteína codificada y/o a la presencia de una proteína aberrante. En una realización preferida, el método de la invención y el oligonucleótido de la invención se aplican a genes asociados a enfermedades que llevan secuencias repetitivas y, por tanto, regiones con una identidad de secuencia relativamente alta (es decir, al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 % de identidad de secuencia entre una región de un segundo exón y una región de un primer exón como se define en la presente memoria). Son ejemplos no limitantes genes con repeticiones de tipo espectrina (como las del gen DMD implicado en la distrofia muscular de Duchenne como se describe en la presente memoria), repeticiones tipo Kelch (como las del gen KLHL3 implicado en la hipertensión hiperpotasémica familiar (Louis-Dit-Picard H et al.), el gen KLHL6 implicado en la leucemia linfocítica crónica (Puente XS et al.), el gen KLHL7 implicado en la retinitis pigmentosa (Friedman JS et al.), los genes KLHL7/12 implicados en el síndrome de Sjögren (Uchida K et al.), el gen KLHL9 implicado en la miopatía distal (Cirak S et al.), el gen KLHL16 o GAN implicado en la neuropatía axonal gigante (Bomont P et al.), el gen KLHL19 o KEAP1 implicado en diversos tipos de cáncer (Dhanoa BS et al.), el gen KLHL20 implicado en la leucemia promielocítica (Dhanoa BS et al.), o el gen KLHL37 o ENC1 implicado en tumores cerebrales (Dhanoa BS et al.)), repeticiones tipo FGF, repeticiones de tipo EGF (tales como las del gen NOTCH3 implicado en CADASIL (Chabriat H et al.), los genes SCUBE implicados en cáncer o enfermedad metabólica ósea, el gen neurexina-1 (NRXN1) implicado en trastornos neuropsiquiátricos y epilepsia generalizada idiopática (Moller RS et al.), el gen Del-1, el gen Tenascina-C (TNC) implicado en la aterosclerosis y arteriopatía coronaria (Mollie A et al.), el gen THBS3, o el gen Fibrilina (FBN1) implicado en el síndrome de Marfan (Rantamaki T et al.)), repeticiones de tipo ankirina (tales como las del gen ANKRD1 implicado en la miocardiopatía dilatada (Dubosq-Bidot L et al.), el gen ANKRD2, el gen ANKRD11 implicado en el síndrome de KBG (Sirmaci A et al.), el gen ANKRD26 implicado en la trombocitopenia (Noris P et al.), o diabetes (Raciti GA et al.) el gen ANKRD55 implicado en la esclerosis múltiple (Alloza I et al.), o el gen TRPV4 implicado en la atrofia muscular espinal distal (Fiorillo C et al.)), repeticiones de tipo HEAT (tales como las del gen htt implicado en la enfermedad de Huntington), repeticiones de tipo anexina, repeticiones ricas en leucina (tales como las de los genes NLRP2 y NLRP7 implicados en el aborto espontáneo recurrente idiopático (Huang JY et al.), el gen LRRK2 implicado en la enfermedad de Parkinson (Abeliovich A et al.), el gen NLRP3 implicado en la enfermedad de Alzheimer o meningitis (Heneka MT et al.), el gen NALP3 implicado en la insuficiencia renal (Knauf F et al.), o el gen LRIG2 implicado en el síndrome urofacial (Stuart HM et al.), o dominios inhibidores de serina proteasa (como los del gen SPINK5 implicado en el síndrome de Netherton (Hovnanian A et al.), como se describe en Andrade M.A. et al.

35 Dentro del contexto de la invención, un pre-ARNm preferido o una transcripción preferida es el pre-ARNm o la transcripción de distrofina. Este pre-ARNm preferido o transcripción preferida es preferiblemente de ser humano. Una enfermedad relacionada con la presencia de una mutación presente en el pre-ARNm de distrofina es la DMD o DMB, dependiendo de la mutación. En la Tabla 2 se identifican combinaciones y regiones preferidas del primer y segundo exones del pre-ARNm de distrofina para su uso en el contexto de la invención.

40 En una realización preferida, se usa un compuesto de la invención para inducir la omisión de exones en una célula, en un órgano, en un tejido y/o en un paciente, preferiblemente en un paciente con DMB o DMD o en una célula, órgano, tejido procedente de dicho paciente. La omisión de exones da como resultado un ARNm maduro que no contiene ningún exón omitido y, por tanto, cuando dicho exón codifica aminoácidos, puede conducir a la expresión de un producto de distrofina alterado, truncado internamente, aunque en parte mayoritariamente funcional. La tecnología de omisión de exones se dirige actualmente hacia el uso de OAS o construcciones génicas que transcriben OAS. Las técnicas de omisión de exones se exploran actualmente para luchar contra las distrofias musculares genéticas. Recientemente, nosotros y otros autores, hemos informado sobre resultados prometedores sobre la terapia de omisión de exones inducida por OAS con el objetivo de restablecer el marco de lectura del pre-ARNm de distrofina en células de ratones *mdx* y de pacientes con DMD (Heemskerk H., et al.; Cirak S., et al.; Goemans et al.), mediante la omisión selectiva de un exón específico, un fenotipo de DMD grave (que carece de distrofina funcional) se convierte en un fenotipo de DMO más leve (que expresa distrofina funcional o semifuncional). La omisión de un exón se induce preferiblemente por la unión de OAS dirigidos a una secuencia de exón interna.

A continuación, la invención se ilustra mediante un pre-ARNm de distrofina mutado en donde están presentes un primer y un segundo exones. Como se define en la presente memoria, un pre-ARNm de distrofina significa preferiblemente un pre-ARNm de un gen DMD que codifica una proteína de distrofina. Un pre-ARNm de distrofina mutado corresponde a un pre-ARNm de un paciente con DMB o DMD con una mutación cuando se compara con un pre-ARNm de DMD de tipo silvestre de una persona no afectada, dando como resultado (niveles reducidos de) una proteína aberrante (DMB) o la ausencia de distrofina funcional (DMD). Un pre-ARNm de distrofina también se denomina pre-ARNm de DMD. Un gen de distrofina también puede denominarse un gen DMD. Distrofina y DMD se pueden usar indistintamente en toda la solicitud.

Preferiblemente, se pretende que un paciente signifique un paciente que tiene DMD o DMB como se define más adelante en la presente memoria o un paciente susceptible de desarrollar DMD o DMB debido a sus antecedentes

genéticos. En el caso de un paciente con DMD, un compuesto usado corregirá preferiblemente una mutación presente en el gen DMD de dicho paciente y, por lo tanto, creará preferiblemente una proteína de distrofina que se parecerá a una proteína de distrofina de un paciente con DMB: dicha proteína será preferiblemente una distrofina funcional o semifuncional, como se define más adelante en la presente memoria. En el caso de un paciente con DMB, preferiblemente un oligonucleótido antisentido de la invención modificará una mutación como la que está presente en el gen de DMB de dicho paciente y creará preferiblemente una distrofina que será más funcional que la distrofina que estaba originalmente presente en dicho paciente con DMB.

Como se define en la presente memoria, una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina de tipo silvestre que corresponde a una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos como se identifica en la SEQ ID NO: 1. Una distrofina funcional es preferiblemente una distrofina, que tiene un dominio de unión activo en su parte N terminal (primeros 240 aminoácidos en el extremo N), un dominio rico en cisteína (aminoácidos 3361 hasta 3685) y un dominio C terminal (últimos 325 aminoácidos en el extremo C), estando cada uno de estos dominios presente en una distrofina de tipo silvestre como sabe el experto en la técnica. Los aminoácidos indicados en la presente memoria corresponden a aminoácidos de la distrofina de tipo silvestre representados por la SEQ ID NO: 1. En otras palabras, una distrofina funcional o semifuncional es una distrofina que presenta, al menos en cierta medida, una actividad de una distrofina de tipo silvestre. "Al menos en cierta medida" significa preferiblemente al menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 % de una actividad correspondiente a la de una distrofina funcional de tipo silvestre. En este contexto, una actividad de una distrofina funcional se une preferiblemente a la actina e interacciona con el complejo de glucoproteína asociado a distrofina (DGC, *dystrophin-associated glycoprotein*) o (DAGC, *dystrophin-associated glycoprotein complex*) (Ehmsen J et al.). La unión de la distrofina con la actina y con el complejo DGC puede visualizarse mediante coimmunoprecipitación utilizando extractos de proteína total o análisis de inmunofluorescencia de cortes transversales de una biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico, como sabe el experto en la técnica.

Los individuos que padecen DMD normalmente tienen una mutación en el gen que codifica la distrofina que impide la síntesis de la proteína completa, p. ej., una parada prematura impide la síntesis del extremo C. En la DMB, el gen de la distrofina también comprende una mutación, pero esta mutación no interrumpe el marco abierto de lectura y el extremo C se sintetiza. Como resultado, se genera una proteína de distrofina (semi)funcional o funcional que tiene una actividad similar en especie a la de la proteína de tipo silvestre, aunque no necesariamente una cantidad similar de actividad. El genoma de un individuo con DMB normalmente codifica una proteína de distrofina que comprende la parte N terminal (los primeros 240 aminoácidos en el extremo N), un dominio rico en cisteína (aminoácido 3361 hasta 3685) y un dominio C terminal (últimos 325 aminoácidos en el extremo C), pero en la mayoría de los casos, su dominio central en forma de varilla, puede ser más corto que el de una distrofina de tipo silvestre (Monaco A.P., et al.,). La omisión de exones para el tratamiento de DMD normalmente se dirige a eludir la parada prematura en el pre-ARNm omitiendo un exón flanqueante o que contiene la mutación. Esto permite la corrección del marco abierto de lectura y la síntesis de una proteína de distrofina truncada internamente, pero que incluye el extremo C. En una realización preferida, un individuo que tiene DMD, y que se está tratando con un oligonucleótido de la invención, sintetizará una distrofina que presenta, al menos en cierta medida, una actividad similar a la de una distrofina de tipo silvestre. Más preferiblemente, si dicho individuo es un paciente con DMD o se sospecha que es un paciente con DMD, una distrofina (semi)funcional es una distrofina de un individuo que tiene DMB: normalmente dicha distrofina puede interactuar tanto con actina como con DGC o DAGC (Ehmsen J., et al., Monaco A.P., et al.).

El dominio central en forma de varilla de la distrofina de tipo silvestre comprende 24 repeticiones de tipo espectrina (Ehmsen J., et al.). En muchos casos, El dominio central en forma de varilla en proteínas similares a las de la DMB es más corto que el de una distrofina de tipo silvestre (Monaco A.P., et al.). Por ejemplo, un dominio central en forma de varilla de una distrofina como se proporciona en la presente memoria puede comprender de 5 a 23, de 10 a 22 o de 12 a 18 repeticiones de tipo espectrina, siempre que pueda unirse a la actina y al DGC.

El alivio de uno o más síntomas de DMD o DMB en un individuo usando un compuesto de la invención, puede evaluarse mediante cualquiera de los siguientes ensayos: prolongación del tiempo hasta la pérdida de la marcha, mejora de la fuerza muscular, mejora de la capacidad de levantar peso, mejora del tiempo necesario para levantarse del suelo, mejora en el tiempo de marcha de nueve metros, mejora en el tiempo necesario para subir cuatro escalones, mejora del grado de función de la pierna, mejora de la función pulmonar, mejora de la función cardíaca, mejora de la calidad de vida. El experto en la técnica conoce cada uno de estos ensayos. Como ejemplo, la publicación de Manzur et al. (Manzur AY et al.) ofrece una amplia explicación de cada uno de estos ensayos. Para cada uno de estos ensayos, tan pronto como se haya encontrado una mejora o prolongación detectable de un parámetro medido en un ensayo, preferiblemente significará que usando un compuesto de la invención, se han aliviado uno o más síntomas de DMD o DMB en un individuo. La mejora o prolongación detectable es preferiblemente una mejora o prolongación estadísticamente significativa como se describe en Hodgetts et al (Hodgetts S., et al.). Como alternativa, el alivio de uno o más síntomas de DMD o DMB puede evaluarse midiendo una mejora de una función, integridad y/o supervivencia de una fibra muscular.

En un método preferido, se alivia uno o más síntomas de un paciente con DMD o DMB y/o se mejora una o más características de uno o más miocitos de un paciente con DMD o DMB. Dichos síntomas o características pueden evaluarse a nivel celular, tisular o en el propio paciente.

Mediante cualquiera de los siguientes ensayos, en una célula miogénica o miocito de ese paciente se puede evaluar un alivio de una o más características de un miocito de un paciente con DMD o DMB: absorción reducida de calcio por parte de los miocitos, disminución de la síntesis de colágeno, morfología alterada, alteración de la biosíntesis de lípidos, disminución del estrés oxidativo y/o mejora de la función, integridad y/o supervivencia de la fibra muscular. Estos parámetros generalmente se evalúan usando inmunofluorescencia y/o análisis histoquímicos de cortes transversales de biopsias de músculo.

La mejora de la función, integridad y/o supervivencia de la fibra muscular puede evaluarse utilizando al menos uno de los siguientes ensayos: una disminución detectable de creatina cinasa en sangre, una disminución detectable de necrosis de las fibras musculares en un corte transversal de biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico, y/o un aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de las fibras musculares en un corte transversal de biopsia de un músculo que se sospecha que es distrófico. El experto en la técnica conoce cada uno de estos ensayos.

La creatina cinasa se puede detectar en la sangre como describen Hodgetts et al (Hodgetts S., et al.). Una disminución detectable en la creatina cinasa puede significar una disminución de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más en comparación con la concentración de creatina cinasa en un mismo paciente con DMD o DMB antes del tratamiento.

Una disminución detectable de necrosis de las fibras musculares se evalúa preferiblemente en una biopsia de músculo, más preferiblemente como describen Hodgetts et al (Hodgetts S., et al.) utilizando cortes transversales de biopsia. Una disminución detectable de necrosis puede ser una disminución de 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más de la zona en donde se ha identificado la necrosis usando cortes transversales de biopsia. La disminución se mide en comparación con la necrosis evaluada en un mismo paciente con DMD o DMB antes del tratamiento.

Un aumento detectable de la homogeneidad del diámetro de una fibra muscular se evalúa preferiblemente en un corte transversal de una biopsia de músculo, más preferiblemente como describen Hodgetts et al (Hodgetts S., et al.). El aumento se mide en comparación con la homogeneidad del diámetro de una fibra muscular en un mismo paciente con DMD o BMD antes del tratamiento.

Preferiblemente, un oligonucleótido de la invención proporciona a dicho individuo (niveles más altos de) una proteína de distrofina funcional y/o (semi) funcional (tanto para la DMD como para la BMD) y/o puede disminuir, al menos en parte, la producción de una proteína de distrofina aberrante en dicho individuo. En este contexto, "una" distrofina funcional y/o "una" distrofina semifuncional puede significar que podrían generarse diversas formas de distrofina funcional y/o semifuncional. Esto puede esperarse cuando una región de una identidad de al menos 50 % entre un primer y un segundo exones se solapa con una o más regiones diferentes de una identidad de al menos 50 % entre otros primer y segundo exones, y cuando dicho oligonucleótido es capaz de unirse a dicha parte solapante de tal manera que se omiten varios tramos de exones diferentes y se producen varias transcripciones diferentes en marco. Esta situación se ilustra en el ejemplo 4, en donde un monooligonucleótido según la invención (PS816; SEQ ID NO: 1679) puede inducir la producción de diversas transcripciones en marco, compartiendo todas ellas el exón 10 como primer exón y en donde el segundo exón puede ser el exón 13, 14, 15, 18, 20, 27, 30, 31, 32, 35, 42, 44, 47, 48 o 55.

Los niveles más altos se refieren al aumento de un nivel de la proteína de distrofina funcional y/o (semi) funcional en comparación con un nivel correspondiente de una proteína de distrofina funcional y/o (semi) funcional en un paciente antes del inicio del tratamiento con un oligonucleótido de la invención. El nivel de dicha proteína de distrofina funcional y/o (semi) funcional se evalúa preferiblemente usando análisis de inmunofluorescencia o transferencia Western (para proteínas).

Una disminución de la producción de un ARNm de distrofina aberrante, o de proteína de distrofina aberrante, significa preferiblemente que un 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % o menos de la cantidad inicial de ARNm de distrofina aberrante, o de proteína de distrofina aberrante, sigue siendo detectable mediante RT PCR (para ARNm) o mediante análisis de inmunofluorescencia o transferencia Western (para proteínas). En la presente memoria también se hace referencia a un ARNm o una proteína de distrofina aberrante menos funcional (en comparación con una proteína de distrofina funcional de tipo silvestre como se definió anteriormente en este documento) o a un ARNm o a una proteína de distrofina no funcional. Una proteína de distrofina no funcional es preferiblemente una proteína de distrofina que no puede unirse a la actina y/o a miembros del complejo proteico DGC. Normalmente, una proteína de distrofina no funcional o un ARNm de distrofina no tiene, o no codifica, una proteína de distrofina con un extremo C intacto de la proteína. En una realización preferida, se aplica una técnica de omisión de exones (también denominada modulación de ARN o cambio de corte y empalme).

El aumento de la producción de un ARNm y/o de una proteína de distrofina funcional y/o semifuncional, significa preferiblemente que dicho ARNm y/o proteína de distrofina funcional y/o semifuncional es detectable o que está aumentado al menos un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más, en comparación con la cantidad detectable de dicho ARNm y/o proteína detectable al inicio del tratamiento. Dicha detección puede llevarse a cabo utilizando RT-PCR (para ARNm) o análisis de inmunofluorescencia o transferencia Western (para proteínas).

En otra realización, un compuesto de la invención proporciona a dicho individuo una proteína de distrofina funcional o semifuncional. Esta proteína o ARNm de distrofina funcional o semifuncional puede detectarse como una proteína o ARNm de distrofina aberrante como se ha explicado anteriormente en la presente memoria.

Mediante la omisión conjunta dirigida de dichos dos exones (dicho primer y dicho segundo exones), la omisión de uno o más exones adicionales se puede inducir, en donde dichos uno o más exones adicionales se localizan preferiblemente entre dichos primer y dicho segundo exones, y en donde la transcripción de distrofina resultante está en marco (preferiblemente como en la Tabla 1 o 6), un fenotipo de DMD o de DMB grave se convierte en un fenotipo de DMB más leve o incluso asintomático. La omisión conjunta de dichos dos exones se induce preferiblemente a través de la unión de un oligonucleótido a una región de un primer exón del pre-ARNm de distrofina y a través de la unión de un oligonucleótido a una región de un segundo exón dentro del pre-ARNm de distrofina, en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón. Preferiblemente, dicho primer y dicho segundo exones de distrofina, y las regiones de identidad que contienen, son como se identifican en la Tabla 2 o 6. Preferiblemente, dicho oligonucleótido no presenta solapamiento con secuencias no exónicas. Preferiblemente, dicho oligonucleótido no se solapa con los sitios de corte y empalme, al menos no en tanto que estén presentes en un intrón. Preferiblemente, dicho oligonucleótido dirigido hacia una secuencia interna de exón no contiene una secuencia complementaria inversa con respecto a un intrón adyacente. Preferiblemente se aplica una técnica de omisión de exones, de tal manera que la ausencia de dichos dos exones, preferiblemente de uno o más exones adicionales, más preferiblemente situados entre dicho primer y dicho segundo exones, a partir de un ARNm producido a partir de un pre-ARNm de DMD, genera una región codificante para la expresión (más alta) de una proteína de distrofina más (semi) funcional aunque más corta. En este contexto (normalmente un paciente con DMB), la inhibición de la inclusión de dichos dos exones, preferiblemente de uno o más exones adicionales localizados entre dicho primer y dicho segundo exones, significa preferiblemente que:

- el nivel del ARNm de distrofina original, aberrante (menos funcional) disminuye al menos un 5 % según lo evaluado mediante RT-PCR, o que un nivel de proteína de distrofina aberrante correspondiente disminuye al menos un 2 % según lo evaluado mediante análisis de inmunofluorescencia o transferencia Western usando anticuerpos antidistrofina; y/o
- una transcripción en marco que codifica una proteína de distrofina semifuncional o funcional es detectable o su nivel aumenta al menos un 5 % según lo evaluado mediante RT-PCR (a nivel de ARNm) o al menos un 2 % según lo evaluado mediante análisis de inmunofluorescencia o transferencia Western usando anticuerpos antidistrofina (a nivel de proteína).

Preferiblemente, la disminución de la proteína de distrofina aberrante, menos funcional o no funcional, es al menos de un 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % y está preferiblemente en línea o en paralelo a la detección o al aumento de la producción de una proteína o transcripción de distrofina más funcional o semifuncional. En este contexto (normalmente un paciente con DMD), la inhibición de la inclusión de dichos dos exones, preferiblemente de uno o más exones adicionales localizados entre dicho primer y dicho segundo exones, significa preferiblemente que dicho individuo recibe (niveles más altos de) un ARNm o una proteína de distrofina más funcional o (semi) funcional.

Una vez que un paciente con DMD recibe (niveles más altos de) una proteína de distrofina (más) funcional o semifuncional, la causa de la DMD se alivia, al menos en parte. Así pues, sería de esperar entonces que los síntomas de DMD estén suficientemente reducidos. La presente invención proporciona además la idea de que la omisión de un tramo completo de al menos dos exones de distrofina de un pre-ARNm que comprende dichos exones, se induce o mejora, cuando se usa un monooligonucleótido dirigido (o capaz de unirse a, o hibridarse con, o ser complementario inverso con respecto a, o capaz de dirigirse a) ambos exones externos de dicho tramo. A lo largo de la solicitud, en una realización preferida, un oligonucleótido de la invención es, por lo tanto, al menos 80 % complementario inverso con respecto a dicha región de dicho primer exón y al menos 45 % complementario inverso con respecto a dicha región de dicho segundo exón como se define en la presente memoria, en donde dichos primer y segundo exones se corresponden con los exones externos del tramo de exón que se va a omitir. Más preferiblemente, dicho oligonucleótido es al menos 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario inverso con respecto a dicha región de dicho primer exón y al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % complementario inverso con respecto a dicha región de dicho segundo exón. La frecuencia de omisión mejorada también aumenta el nivel de proteína de distrofina más (semi) funcional producida en un miocito de un individuo con DMD o DMB.

Un oligonucleótido según la presente invención que se usa preferiblemente, es preferiblemente complementario inverso con respecto a, o es capaz de unirse, o hibridarse con, o dirigirse a, una región de un primer exón de distrofina, teniendo dicha región al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos, es preferiblemente complementario inverso con respecto a, o es capaz de unirse, o hibridarse con, o dirigirse a, una región de un segundo exón de distrofina, teniendo dicha región al menos 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 90, 100, 110, 120, 130,

140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos, en donde dicha región de dicho segundo exón dentro del mismo pre-ARNm tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón.

5 Dentro del contexto de la invención, un oligonucleótido puede comprender o consistir en un equivalente funcional de un oligonucleótido. Un equivalente funcional de un oligonucleótido significa preferiblemente un oligonucleótido como se define en la presente memoria en donde uno o más nucleótidos se han sustituido y en donde una actividad de dicho equivalente funcional se conserva al menos en cierta medida. Preferiblemente, una actividad de dicho compuesto que comprende un equivalente funcional de un oligonucleótido, es proporcionar una proteína de distrofina funcional o semifuncional. Por lo tanto, dicha actividad de dicho compuesto que comprende un equivalente funcional de un oligonucleótido, se evalúa preferiblemente cuantificando la cantidad de una proteína de distrofina funcional o semifuncional. En la presente memoria, una distrofina funcional o semifuncional se define preferiblemente como una distrofina que puede unirse a la actina y a miembros del complejo proteico DGC y dar soporte y flexibilidad a la estructura membranosa de las fibras musculares. La evaluación de dicha actividad de un compuesto que comprende un oligonucleótido funcional o equivalente incluye preferiblemente RT-PCR (para detectar la omisión de exones a nivel de ARN) y/o análisis de inmunofluorescencia o transferencia Western (para detectar la expresión y localización de proteínas). Dicha actividad se conserva preferiblemente al menos en cierta medida cuando representa al menos 50 %, o al menos 60 %, o al menos 70 % o al menos 80 % o al menos 90 % o al menos 95 % o más de la actividad correspondiente de dicho compuesto que comprende un oligonucleótido del que procede el equivalente funcional. A lo largo de esta solicitud, cuando se usa la palabra oligonucleótido esta puede reemplazarse por un equivalente funcional del mismo como se define en la presente memoria.

20 Así pues, el uso de un oligonucleótido, o de un equivalente funcional del mismo, que comprende o consiste en una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o es complementaria inversa con respecto a una región de un primer exón de distrofina, que puede unirse con, dirigirse a, hibridarse con y/o es complementaria inversa con respecto a una región de un segundo exón de distrofina y en donde dicha región del segundo exón dentro del pre-ARNm de distrofina tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón, presenta los siguientes resultados terapéuticos para la DMD:

- aliviar uno o más síntomas de DMD o BMD; y/o
- 30 - aliviar una o más características de un miocito de un paciente; y/o
- proporcionar a dicho individuo una proteína de distrofina funcional o semifuncional; y/o
- disminuir, al menos en parte, en dicho individuo, la producción de una proteína de distrofina aberrante.

Cada una de estas características ya se ha definido en la presente memoria.

35 Preferiblemente, un oligonucleótido comprende o consiste en una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o es complementaria inversa con respecto a una región de un primer exón de DMD o distrofina, en donde una región de un segundo exón de DMD o distrofina dentro del mismo pre-ARNm, tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón. Dicho primer y segundo exones se seleccionan preferiblemente del grupo de exones que incluye los exones 8 a 60, en donde cuando el tramo de exones que comienza con el primer exón y que comprende el segundo exón como último exón, se omite, produce una transcripción en marco. En las Tablas 1, 2 o 6, se ofrecen las combinaciones de exones en marco preferidas en el ARNm de distrofina.

40 Sin querer limitarse a ninguna teoría, la identidad del primer y segundo exones de distrofina puede estar determinada por uno o más de los siguientes aspectos. En una realización, uno o más intrones presentes entre el primer exón y el segundo exón no son excepcionalmente grandes. En este contexto, un intrón excepcionalmente grande en el gen de la distrofina puede tener 70, 80, 90, 100, 200 kb (kilobases) o más; por ejemplo, intrón 1 (~ 83 kb), intrón 2 (~ 170 kb), intrón 7 (~ 110 kb), intrón 43 (~ 70 kb), intrón 44 (~ 248 kb), intrón 55 (~ 119 kb), o intrón 60 (~ 96 kb). Además, en una realización adicional, puede que ya exista un ejemplo de un paciente con DMB que exprese una proteína de distrofina truncada, en donde este primer, este segundo y el tramo de exones de dicho primer exón a dicho segundo exón se había delecionado. Otro criterio puede ser la aplicabilidad relativamente grande de los exones omitidos para subpoblaciones combinadas de pacientes con DMD (y/o DMB) con mutaciones relevantes específicas.

50 En una realización preferida, se omite un tramo de exones de DMD en marco (más preferiblemente se omite por completo dentro de una transcripción), en donde los exones externos están definidos por un primer y un segundo exón de la siguiente manera:

- el primer exón es el exón 8 y el segundo exón es el exón 19 (aplicable a ~ 7 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 9 y el segundo exón es el exón 22 (aplicable a ~ 11 % de los pacientes con DMD),
- 55 - el primer exón es el exón 9 y el segundo exón es el exón 30 (aplicable a ~ 14 % de los pacientes con DMD),

- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el exón 18 (aplicable a ~ 5 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el exón 30 (aplicable a ~ 13 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el exón 42 (aplicable a ~ 16 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el exón 47 (aplicable a ~ 29 % de los pacientes con DMD),
- 5 - el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el exón 57 (aplicable a ~ 72 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el exón 60 (aplicable a ~ 72 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 11 y el segundo exón es el exón 23 (aplicable a ~ 8 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 13 y el segundo exón es el exón 30 (aplicable a ~ 10 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 23 y el segundo exón es el exón 42 (aplicable a ~ 7 % de los pacientes con DMD),
- 10 - el primer exón es el exón 34 y el segundo exón es el exón 53 (aplicable a ~ 42 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 40 y el segundo exón es el exón 53 (aplicable a ~ 38 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 44 y el segundo exón es el exón 56 (aplicable a ~ 40 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 45 y el segundo exón es el exón 51 (aplicable a ~ 17 % de los pacientes con DMD)
- el primer exón es el exón 45 y el segundo exón es el exón 53 (aplicable a ~ 28 % de los pacientes con DMD),
- 15 - el primer exón es el exón 45 y el segundo exón es el exón 55 (aplicable a ~ 33 % de los pacientes con DMD),
- el primer exón es el exón 45 y el segundo exón es el exón 60 (aplicable a ~ 37 % de los pacientes con DMD), o
- el primer exón es el exón 56 y el segundo exón es el exón 60 (aplicable a ~ 2 % de los pacientes con DMD).

Por lo tanto, en una realización, un oligonucleótido de la invención induce la omisión de los siguientes exones de distrofina: exones 8 a 19, exones 9 a 22, exones 9 a 30, exones 10 a 18, exones 10 a 30, exones 10 a 42, exones 10 a 47, exones 10 a 57, exones 10 a 60, exones 11 a 23, exones 13 a 30, exones 23 a 42, exones 34 a 53, exones 40 a 53, exones 44 a 56, exones 45 a 51, exones 45 a 53, exones 45 a 55, exones 45 a 60 o exones 56 a 60.

Preferiblemente, un oligonucleótido de la invención comprende o consiste en una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con y/o es complementaria inversa con respecto a una región de un primer exón del pre-ARNm de distrofina de tal manera que la parte complementaria inversa es al menos el 30 % de la longitud de dicho oligonucleótido de la invención, más preferiblemente al menos el 40 %, incluso más preferiblemente al menos 50 %, incluso más preferiblemente al menos 60 %, incluso más preferiblemente al menos 70 %, incluso más preferiblemente al menos 80 %, incluso más preferiblemente al menos 90 % o incluso más preferiblemente al menos 95 %, o incluso más preferiblemente 98 % y lo más preferiblemente hasta 100 %. En este contexto, un primer exón es preferiblemente el exón 8, 9, 10, 11, 13, 23, 34, 40, 44, 45 o 56 de pre-ARNm de distrofina como se define en la presente memoria.

Dicho oligonucleótido puede comprender secuencias flanqueantes adicionales. En una realización más preferida, la longitud de dicha parte complementaria inversa de dicho oligonucleótido es de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos. Se pueden usar varios tipos de secuencias flanqueantes. Preferiblemente, las secuencias flanqueantes se usan para modificar la unión de una proteína con dicho oligonucleótido, o para modificar una propiedad termodinámica de dicho oligonucleótido, más preferiblemente para modificar la afinidad de unión del ARN diana. En otra realización preferida, las secuencias flanqueantes adicionales son complementarias inversas con respecto a secuencias del pre-ARNm de distrofina que no están presentes en dicho exón.

En una realización preferida, un oligonucleótido comprende o consiste en una secuencia que puede unirse a, dirigirse a, hibridarse con, y es complementaria inversa con respecto a al menos una región de un primer exón y a una región de un segundo exón de distrofina, tal como está presente en un pre-ARNm de distrofina, en donde dichos primer y segundo exones se seleccionan del grupo de exones 8 (SEQ ID NO: 2), 9 (SEQ ID NO: 3), 10 (SEQ ID NO: 4), 11 (SEQ ID NO: 1761), 13 (SEQ ID NO: 1762), 18 (SEQ ID NO: 5), 19 (SEQ ID NO: 6), 22 (SEQ ID NO: 7), 23 (SEQ ID NO: 8), 30 (SEQ ID NO: 9), 34 (SEQ ID NO: 1763), 40 (SEQ ID NO: 1764), 42 (SEQ ID NO: 11), 44 (SEQ ID NO: 1765), 45 (SEQ ID NO: 12), 47 (SEQ ID NO: 10), 51 (SEQ ID NO: 1760), 53 (SEQ ID NO: 13), 55 (SEQ ID NO: 14), 56 (SEQ ID NO: 15), 57 (SEQ ID NO: 1744) o 60 (SEQ ID NO: 16), y dichas regiones tienen al menos 10 nucleótidos. Sin embargo, dichas regiones también pueden tener al menos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más nucleótidos. Para los exones preferidos identificados anteriormente, utilizando técnicas conocidas en la materia, el experto en la técnica puede identificar una región de un primer exón y una región

de un segundo exón. Más preferiblemente, se usa la herramienta en línea EMBOSS Matcher como se explicó anteriormente en la presente memoria. Incluso más preferiblemente, regiones de identidad preferidas de un primer y segundo exones de distrofina a las cuales se une preferiblemente un oligonucleótido de la invención y/o es al menos en parte complementario inverso con respecto a ellas, se han proporcionado en la Tabla 2. En este contexto, la complementariedad inversa es preferiblemente de al menos 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %. Una secuencia de oligonucleótidos preferida para su uso en la invención que puede unirse con, hibridarse con, dirigirse a y/o es complementaria inversa con respecto a una región de identidad entre dichos primer y segundo exones, preferiblemente de la Tabla 2, tiene una longitud de al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 nucleótidos, más preferiblemente menor de 40 nucleótidos o más preferiblemente menor de 30 nucleótidos, incluso más preferiblemente menor de 25 nucleótidos y lo más preferiblemente de 20 a 25 nucleótidos. En este contexto, la complementariedad inversa es preferiblemente de al menos 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

En una realización, un oligonucleótido preferido es tal que el primer y el segundo exones de distrofina son como se identifican en las tablas 1, 2 o 6 y dicho oligonucleótido es capaz de unirse a las regiones correspondientes del primer y segundo exones como se identifica en las tabla 2 o 6 y como se define en la SEQ ID NO: 17 a 1670, 1742, 1743 o 1766 a 1777.

Los oligonucleótidos preferidos se describen en la Tabla 3 y comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1671-1741. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1778-1891 como se describe en la Tabla 6. Los oligonucleótidos preferidos comprenden la SEQ ID NO: 1671-1741 o 1778-1891 y tienen 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos más o 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos menos que su SEQ ID NO exacta como se indica en las tablas 3 o 6. Estos nucleótidos adicionales pueden estar presentes en el lado 5' o 3' de una SEQ ID NO determinada. Estos nucleótidos ausentes pueden ser nucleótidos presentes en el lado 5' o 3' de una SEQ ID NO determinada. Cada uno de estos oligonucleótidos puede tener cualquiera de las químicas definidas anteriormente en la presente memoria o combinaciones de las mismas. En cada uno de los oligonucleótidos identificados por una SEQ ID NO de la presente memoria, una U puede reemplazarse por una T.

Los oligonucleótidos más preferidos se representan a continuación.

Si el primer exón de distrofina es el exón 8 y el segundo exón de distrofina es el exón 19, una región preferida del exón 8 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 17 y una región preferida del exón 19 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 18. Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1722 o 1723, o comprende la SEQ ID NO: 1722 o 1723 y tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 13, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 101 y una región preferida del exón 13 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 102.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 14, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 103 y una región preferida del exón 14 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 104.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 15, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 105 y una región preferida del exón 15 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 106.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 18, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 109 y una región preferida del exón 18 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 110. Los oligonucleótidos preferidos comprenden:

- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1679 a 1681, 1778, 1812, 1813, 1884 a 1886, 1890 o 1891, y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos o
- una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1814 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1815 a 1819 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1820, 1824, y que tiene una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1826, 1782, 1832 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1821, 1825, 1780 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o

ES 2 758 982 T3

- una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1822 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1823, 1781, 1829, 1830, 1831 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos,
 - 5 - una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1887 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1888 o 1889 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 10 - una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1827 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1828 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.
- Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 18, otra región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1766 y otra región preferida del exón 18 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1767. Los oligonucleótidos preferidos comprenden una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1783, 1833, 1834, 1835 y tienen una longitud de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.
- Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 18, otra región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1768 y otra región preferida del exón 18 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1769. Los oligonucleótidos preferidos comprenden una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1673 o 1674 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.
- Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 20, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 111 y una región preferida del exón 20 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 112.
- 25 Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 27, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 121 y una región preferida del exón 27 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 122.
- Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 30, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 127 y una región preferida del exón 30 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 128. Los oligonucleótidos preferidos comprenden:
- 30
 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1679 a 1681, 1812, 1813, 1884 a 1886, 1890 o 1891 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos o
 - una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1814 y tienen una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - 35
 - una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1675 o 1676 y tienen una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1677 o 1678 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 40
 - una secuencia de bases tal como se define en cualquiera de las SEQ ID NO: 1784, 1836 y tienen una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1786, 1838 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - una secuencia de bases como se define en cualquiera de SEQ ID NO: 1780 y tienen una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 45
 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1785, 1837 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 30, otra región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1772 y otra región preferida del exón 30 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1773. Los oligonucleótidos preferidos comprenden:

- 50
 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1688, 1689, 1839, 1840, 1841,

1842, 1843 o 1844 y tienen una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos o

- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1845, 1846, 1847, 1848 y tienen una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 5 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1849, 1850 y tienen una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- una secuencia de bases tal como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1787, 1851 y tienen una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

10 Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 31, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 129 y una región preferida del exón 31 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 130.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 32, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 131 y una región preferida del exón 32 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 132.

15 Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 35, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 137 y una región preferida del exón 35 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 138.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 42, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 151 y una región preferida del exón 42 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 152.

20 Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 44, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 153 y una región preferida del exón 44 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 154.

25 Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 47, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 157 y una región preferida del exón 47 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 158.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 48, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 159 y una región preferida del exón 48 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 160.

30 Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 55, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 167 y una región preferida del exón 55 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 168.

Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 57, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 169 y una región preferida del exón 57 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 170.

35 Si el primer exón de distrofina es el exón 10 y el segundo exón de distrofina es el exón 60, una región preferida del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 173 y una región preferida del exón 60 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 174.

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1673 o comprende la SEQ ID NO: 1673 y tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

40 Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1675 o comprende la SEQ ID NO: 1675 y tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1677 o comprende la SEQ ID NO: 1677 y tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

45 Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1679 o comprende la SEQ ID NO: 1679 y tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Un oligonucleótido preferido comprende la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1679 y tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Opcionalmente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 de las Ues de la SEQ ID NO: 1679 se han reemplazado por una T. En una realización preferida, todas las Ues de la SEQ ID NO: 1679 se han reemplazado por T. Un oligonucleótido preferido que comprende la SEQ ID NO: 1679 comprende cualquiera de las químicas definidas anteriormente en la presente memoria: una modificación de bases y/o una modificación de azúcar y/o una modificación de la cadena principal.

50

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1681 o comprende la SEQ ID NO: 1681 y tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1684 o comprende la SEQ ID NO: 1684 y tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

- 5 Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1685 o comprende la SEQ ID NO: 1685 y tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1686 o comprende la SEQ ID NO: 1686 y tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

- 10 Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1688 o comprende la SEQ ID NO: 1688 y tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Un oligonucleótido preferido comprende la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 1688 y tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Opcionalmente, 1, 2, 3, 4, 5, 6 de las Ues de la SEQ ID NO: 1688 se han reemplazado por una T. En una realización preferida, todas las Ues de la SEQ ID NO: 1688 se han reemplazado por T. Un oligonucleótido preferido que comprende la SEQ ID NO: 1688 comprende cualquiera de las químicas definidas anteriormente en la presente memoria: una modificación de bases y/o una modificación de azúcar y/o una modificación de la cadena principal.

- 20 Para cada uno de los oligonucleótidos representados por las SEQ ID NO: 1673, 1675, 1677, 1679, 1681, 1684, 1685, 1686 y 1688, el primer exón de distrofina es el exón 10. Sin embargo, el segundo exón de distrofina es el exón 13, 14, 15, 18, 20, 27, 30, 31, 32, 35, 42, 44, 47, 48, 55, 57 o 60. Esto significa que usando cualquiera de estos oligonucleótidos, puede producirse la formación de varias transcripciones en marco, conduciendo cada una de ellas a la producción de una proteína de distrofina truncada aunque (semi)funcional.

Si el primer exón de distrofina es el exón 11 y el segundo exón de distrofina es el exón 23, una región preferida del exón 23 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 191 y una región preferida del exón 23 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 192. Los oligonucleótidos preferidos comprenden:

- 25 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1794, 1861, 1795, 1862 y tienen una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1796, 1863, 1797, 1864 y tienen una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1798, 1865, 1799, 1866 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

- 30 Si el primer exón de distrofina es el exón 13 y el segundo exón de distrofina es el exón 30, una región preferida del exón 13 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 285 y una región preferida del exón 30 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 286. Los oligonucleótidos preferidos comprenden:

- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1808, 1867, 1809, 1868, 1810, 1869, 1858, 1873 y tienen una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos

- 35 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1811, 1870, 1859, 1874 y tienen una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o

- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1856, 1871, 1860, 1875 y que tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o

- 40 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1857, 1872 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

Si el primer exón de distrofina es el exón 23 y el segundo exón de distrofina es el exón 42, una región preferida de exón 23 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 776 y una región preferida de exón 42 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 777. Los oligonucleótidos preferidos comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1698-1703.

- 45 Si el primer exón de distrofina es el exón 34 y el segundo exón de distrofina es el exón 53, una región preferida del exón 34 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1294 y una región preferida del exón 53 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1295. Los oligonucleótidos preferidos comprenden:

- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEC ID NO: 1800, 1876, 1801, 1877 y tienen una longitud de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos o

- 50 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1802, 1878, 1803, 1879 y tienen una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

Si el primer exón de distrofina es el exón 40 y el segundo exón de distrofina es el exón 53, una región preferida del exón 40 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1477 y una región preferida del exón 53 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1478. Los oligonucleótidos preferidos comprenden:

- 5
- una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1804, 1880 y tienen una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1805, 1881 y tienen una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

10

Si el primer exón de distrofina es el exón 44 y el segundo exón de distrofina es el exón 56, una región preferida del exón 44 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1577 y una región preferida del exón 56 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1558. Los oligonucleótidos preferidos comprenden una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1806, 1882, 1807, 1883 y tienen una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

15

Si el primer exón de distrofina es el exón 45 y el segundo exón de distrofina es el exón 51, una región preferida del exón 45 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1567 y una región preferida del exón 51 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1568. Los oligonucleótidos preferidos comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1730-1731.

Si el primer exón de distrofina es el exón 45 y el segundo exón de distrofina es el exón 53, una región preferida del exón 45 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1569 y una región preferida del exón 53 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1570. Los oligonucleótidos preferidos comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1732-1737.

20

Si el primer exón de distrofina es el exón 45 y el segundo exón de distrofina es el exón 55, una región preferida del exón 45 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1571 y una región preferida del exón 55 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1572. Los oligonucleótidos preferidos comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1704-1719, 1788, 1852, 1789, 1853.

25

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1706 o comprende la SEQ ID NO: 1706 y tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Un oligonucleótido preferido comprende la SEQ ID NO: 1706 y tiene una longitud de 25 nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1706.

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1707 o comprende la SEQ ID NO: 1707 y tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Un oligonucleótido preferido comprende la SEQ ID NO: 1707 y tiene una longitud de 25 nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1706.

30

Un oligonucleótido preferido consiste en la SEQ ID NO: 1713 o comprende la SEQ ID NO: 1713 y tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Un oligonucleótido preferido comprende la SEQ ID NO: 1713 y tiene una longitud de 25 nucleótidos que consiste en la SEQ ID NO: 1710.

Los oligonucleótidos preferidos comprenden una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1788, 1852, 1789, 1853 y tienen una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos

35

Si el primer exón de distrofina es el exón 45 y el segundo exón de distrofina es el exón 55, otra región preferida del exón 45 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1774 y otra región preferida del exón 55 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1775. Los oligonucleótidos preferidos comprenden una secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1790, 1854, 1792, 1855 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

40

Si el primer exón de distrofina es el exón 45 y el segundo exón de distrofina es el exón 60, una región preferida del exón 45 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1577 y una región preferida del exón 60 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1578. Los oligonucleótidos preferidos comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1738-1741.

Si el primer exón de distrofina es el exón 56 y el segundo exón de distrofina es el exón 60, una región preferida del exón 56 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1742 y una región preferida del exón 60 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1743. Los oligonucleótidos preferidos comprenden o consisten en las SEQ ID NO: 1720-1721.

Los oligonucleótidos más preferidos comprenden:

45

(a) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1673 o 1674 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o

(b) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1675 o 1676 y tienen una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o

50

(c) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1677 o 1678 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o

ES 2 758 982 T3

- (d) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1679 a 1681 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (e) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1684 a 1686 y tienen una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- 5 (f) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1688 o 1689 y tienen una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (g) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1704 a 1706 y tienen una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos,
- 10 (h) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1707 a 1709 y tienen una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (i) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1710, 1713 a 1717 y tienen una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.
- Los oligonucleótidos aún más preferidos comprenden:
- 15 (a) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1679 a 1681, 1778, 1812, 1813, 1884 a 1886, 1890 o 1891, y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o la SEQ ID NO: 1814 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (b) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1688, 1689 o 1839 a 1844, y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- 20 (c) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1673 o 1674 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (d) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1675 o 1676 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (e) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1677 o 1678 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- 25 (f) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1684 a 1686 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (g) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1704 a 1706 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos,
- 30 (h) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1707 a 1709 y que tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
- (i) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1710, 1713 a 1717 y que tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos o
- (j) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1815 a 1819 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 35 (k) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1820, 1824, y que tiene una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (l) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1826, 1782, 1832 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 40 (m) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1821, 1825, 1780 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (n) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1822 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (o) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1823, 1781, 1829, 1830, 1831 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 45 (p) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1783, 1833, 1834, 1835 y que tiene una longitud de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o

ES 2 758 982 T3

- (q) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1887 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (r) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1888 o 1889 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 5 (s) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1827 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (t) una secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1828 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 10 (u) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1784, 1836 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (v) o la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1786, 1838 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (w) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1780 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 15 (x) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1785, 1837 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (y) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1845, 1846, 1847, 1848 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 20 (z) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1849, 1850 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (a1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1787, 1851 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (b1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1788, 1852, 1789, 1853 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 25 (c1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1790, 1854, 1792, 1855 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (d1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1794, 1861, 1795, 1862 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 30 (e1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1796, 1863, 1797, 1864 y que tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (f1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1798, 1865, 1799, 1866 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (g1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1808, 1867, 1809, 1868, 1810, 1869, 1858, 1873 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 35 (h1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1811, 1870, 1859, 1874 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (i1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1856, 1871, 1860, 1875 y que tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 40 (j1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1857, 1872 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (k1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEC ID NO: 1800, 1876, 1801, 1877 y que tiene una longitud de 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (l1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1802, 1878, 1803, 1879 y que tiene una longitud de 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 45 (m1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1804, 1880 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o

(n1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1805, 1881 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o

(o1) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1806, 1882, 1807, 1883 y que tiene una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

5 El oligonucleótido según la invención, que comprende una secuencia, o consiste en una secuencia, como se define mediante un número de SEQ ID, también pretende incluir un oligonucleótido que comprende la secuencia de bases base como se define en la SEQ ID. En la invención también se incluyen oligonucleótidos que tienen una cadena principal modificada (es decir, residuos de azúcar modificados y/o enlaces internucleósidos modificados) con respecto a los definidos por las SEQ ID. Cada base U en una SEQ ID NO de un oligonucleótido como se identifica en la presente memoria, puede modificarse o reemplazarse por una T.

Composición

15 En un aspecto adicional, se proporciona una composición que comprende un oligonucleótido, como se describe en el apartado anterior titulado "Oligonucleótido". Preferiblemente, esta composición comprende, o consiste en, un oligonucleótido como se describe anteriormente. Una composición preferida comprende un monooligonucleótido, como se definió anteriormente. Por lo tanto, está claro que la omisión de al menos dicho primer y dicho segundo exones se obtiene usando un monooligonucleótido y no usando un cóctel de oligonucleótidos distintos.

20 En una realización preferida, dicha composición es para su uso como un medicamento. Dicha composición es, por lo tanto, una composición farmacéutica. Una composición farmacéutica generalmente comprende un vehículo, diluyente y/o excipiente, farmacéuticamente aceptado. En una realización preferida, una composición de la presente invención comprende un compuesto como se define en la presente memoria y opcionalmente comprende además una formulación, un material de relleno, un conservante, un solubilizante, un vehículo, un diluyente, un excipiente, una sal, un adyuvante y/o un disolvente, farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo, material de relleno, conservante, solubilizante, diluyente, sal, adyuvante, disolvente y/o excipiente, farmacéuticamente aceptable, se puede encontrar, por ejemplo, en Remington. El compuesto como se describe en la invención, posee al menos un grupo ionizable. Un grupo ionizable puede ser una base o un ácido, y puede estar cargado o ser neutro. Un grupo ionizable puede estar presente como un par de iones con un contraión apropiado que lleva una o más cargas opuestas. Son ejemplos de contraiones catiónicos, el sodio, potasio, cesio, Tris, litio, calcio, magnesio, trietilamonio, trietilamonio y tetraetilamonio. Son ejemplos de contraiones aniónicos, el cloruro, bromuro, yoduro, lactato, mesilato, acetato, trifluoroacetato, dicloroacetato y citrato. Se han descrito ejemplos de contraiones (Kumar L.). Por lo tanto, en una realización preferida, un oligonucleótido de la invención se pone en contacto con una composición que comprende dichos grupos ionizables, preferiblemente Ca^{2+} , para formar un complejo de quelato de oligonucleótido que comprende dos o más oligonucleótidos idénticos ligados por dicho catión multivalente como ya se ha definido en la presente memoria.

35 Adicionalmente, puede formularse una composición farmacéutica para ayudar a mejorar la estabilidad, solubilidad, absorción, biodisponibilidad, farmacocinética y captación celular de dicho compuesto, en particular formulaciones que comprendan excipientes o conjugados que sean capaces de formar complejos, nanopartículas, micropartículas, nanotubos, nanogeles, hidrogeles, poloxámeros o plurónicos, polimerosomas, coloides, microburbujas, vesículas, micelas, lipoplejos y/o liposomas. Como ejemplos de nanopartículas se incluyen nanopartículas poliméricas, nanopartículas de oro, nanopartículas magnéticas, nanopartículas de sílice, nanopartículas lipídicas, partículas de azúcar, nanopartículas proteicas y nanopartículas peptídicas.

Una composición preferida comprende al menos un excipiente que puede ayudar adicionalmente a mejorar el direccionamiento y/o suministro de dicha composición y/o dicho oligonucleótido dentro de un músculo y/o una célula. Una célula puede ser un miocito (célula muscular).

45 Otra composición preferida puede comprender al menos un excipiente catalogado como un segundo tipo de excipiente. Un segundo tipo de excipiente puede comprender o contener un grupo conjugado como se describe en la presente memoria para mejorar el direccionamiento y/o suministro de la composición y/o del oligonucleótido de la invención a un tejido y/o célula y/o dentro de un tejido y/o una célula, como por ejemplo, una célula o un tejido muscular. Ambos tipos de excipientes se pueden combinar en una sola composición como se identifica en la presente memoria. En la parte dedicada a las definiciones, se describen grupos conjugados preferidos.

50 El experto en la técnica puede seleccionar, combinar y/o adaptar uno o más de los excipientes y sistemas de suministro alternativos anteriores u otros para formular y suministrar un compuesto para su uso en la presente invención.

55 Dicha composición farmacéutica de la invención puede administrarse a un animal, preferiblemente un mamífero, a una concentración eficaz en tiempos establecidos. El mamífero más preferido es un ser humano. Un compuesto o una composición como se define en la presente memoria para su uso según la invención, puede ser adecuado para su administración directa *in vivo* a una célula, un tejido y/o un órgano de un individuo, preferiblemente dichos individuos están afectados por, o en riesgo de desarrollar, DMB o DMD, y pueden recibir la administración directamente *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. La administración puede realizarse por vía sistémica y/o parenteral, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraventricular, intratecal, intramuscular, intranasal, enteral, intravítrea, intracerebral, epidural u oral.

Preferiblemente, dicha composición farmacéutica de la invención puede encapsularse en forma de una emulsión, suspensión, píldora, comprimido, cápsula o gel blando para administración oral, o en forma de aerosol o polvo seco para administración a las vías respiratorias y los pulmones.

5 En una realización, un compuesto de la invención puede usarse junto con otro compuesto que ya se sabe que se usa para el tratamiento de dicha enfermedad. Dichos otros compuestos pueden usarse para ralentizar la progresión de la enfermedad, para reducir comportamientos o movimientos anómalos, para reducir la inflamación del tejido muscular, para mejorar la función, integridad y/o supervivencia de la fibra muscular y/o mejorar, aumentar o restablecer la función cardíaca. Son ejemplos, pero sin limitación, un esteroide, preferiblemente un (gluco)corticosteroide, un inhibidor de la ECA (preferiblemente perindopril), un bloqueador del receptor de angiotensina II tipo 1 (preferiblemente losartán), un inhibidor del factor alfa de necrosis tumoral (TNF α), un inhibidor de TGF β (preferiblemente decorina), biglicano humano recombinante, una fuente de mIGF-1, un inhibidor de miosatina, manosa-6-fosfato, un antioxidante, un inhibidor del canal iónico, un inhibidor de proteasa, un inhibidor de fosfodiesterasa (preferiblemente un inhibidor de PDE5, tal como sildenafil o tadalafil), L-arginina, bloqueadores de dopamina, amantadina, tetrabenazina y/o coenzima Q10. Este uso combinado puede ser un uso secuencial: cada componente se administra en una composición distinta. Como alternativa, cada compuesto puede usarse conjuntamente en una sola composición.

Usos

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de una composición o de un compuesto, como se describe en la presente memoria, para su uso como un medicamento o como parte de una terapia, o para aplicaciones en las que el compuesto ejerce su actividad de manera intracelular.

20 En una realización preferida, un compuesto o composición de la invención es para su uso como un medicamento, en donde el medicamento es para prevenir, retrasar, mejorar y/o tratar una enfermedad como se define en la presente memoria, preferiblemente DMD o DMB.

Método para prevenir, retrasar, mejorar y/o tratar una enfermedad

25 En la descripción, se proporciona un método para prevenir, retrasar, mejorar y/o tratar una enfermedad como se define en la presente memoria, preferiblemente DMD o DMB. Dicha enfermedad puede prevenirse, tratarse, retrasarse o mejorarse en un individuo, en una célula, en un tejido o en un órgano de dicho individuo. El método comprende administrar un oligonucleótido o una composición de la invención a dicho individuo o sujeto que lo necesite.

30 El método según la descripción, en donde un oligonucleótido o composición como se define en la presente memoria puede ser adecuado para la administración *in vivo* a una célula, un tejido y/o un órgano de un individuo, preferiblemente un individuo afectado por DMB o DMD o en riesgo de desarrollar dicha enfermedad, y puede administrarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*. Un individuo o un sujeto necesitado es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

35 En los métodos de la descripción, una concentración de un oligonucleótido o composición varía de 0,01 nM a 1 μ M. Más preferiblemente, la concentración utilizada es de 0,02 a 400 nM, o de 0,05 a 400 nM o de 0,1 a 400 nM, incluso más preferiblemente de 0,1 a 200 nM.

Los intervalos de dosis de un oligonucleótido o composición según la invención, se diseñan preferiblemente basándose en estudios de intensificación de dosis en ensayos clínicos (uso *in vivo*) para los que existen requisitos protocolarios rigurosos. Se puede usar un oligonucleótido como se define en la presente memoria a una dosis que varía de 0,01 a 200 mg/kg o de 0,05 a 100 mg/kg o de 0,1 a 50 mg/kg o de 0,1 a 20 mg/kg, preferiblemente de 0,5 a 10 mg/kg.

40 Los intervalos de concentración o dosis de un oligonucleótido o composición, como los indicados anteriormente, son concentraciones o dosis preferidas para usos *in vitro* o *ex vivo*. El experto en la técnica comprenderá que, dependiendo de la identidad del oligonucleótido utilizado, de la célula diana a tratar, del gen diana y de sus niveles de expresión, del medio utilizado y de las condiciones de transfección e incubación, la concentración o dosis de dicho oligonucleótido usado puede variar adicionalmente y puede que tenga que optimizarse más.

Definiciones

50 Como se sabe en la técnica, la "identidad de secuencia", es una relación entre dos o más secuencias de ácido nucleico (polinucleótido o nucleótido), según lo determinado al comparar las secuencias. En la técnica, el porcentaje de "identidad" o "similitud" indica el grado de relación de secuencia entre secuencias de ácido nucleico según lo determinado por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. "Identidad" puede ser reemplazada por "similitud" en este documento. Preferiblemente, el porcentaje de identidad se determina comparando la SEQ ID NO completa como se identifica en la memoria descriptiva. Sin embargo, también puede usarse parte de una secuencia. Parte de una secuencia en este contexto puede significar al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de una secuencia o SEQ ID NO determinada.

55 La "identidad" y la "similitud" pueden calcularse fácilmente mediante métodos conocidos, incluidos, sin limitación, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988;

Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M. y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heine, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H. y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Los métodos preferidos para determinar la identidad están diseñados para proporcionar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud están codificados en programas informáticos disponibles al público. Como métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias se incluyen, p. ej., el paquete del programa GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12 (1):387 (1984)), BestFit y FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). La familia de programas BLAST 2.0 que se puede utilizar para búsquedas de similitud de bases de datos incluye, por ejemplo, BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos contra secuencias de bases de datos de nucleótidos. La familia de programas BLAST 2.0 están disponibles al público en el NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)). El muy conocido algoritmo de Smith Waterman también puede usarse para determinar la identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); Matriz de comparación: coincidencias = + 10, emparejamiento erróneo = 0; Penalización por hueco: 50; Penalización por longitud de hueco: 3. Disponible como programa Gap de Genetics Computer Group, ubicado en Madison, Wis. Anteriormente se han proporcionado los parámetros predeterminados para las comparaciones de ácido nucleico.

Otro método preferido para determinar la similitud y la identidad de secuencias es mediante el uso del algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453, Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, págs. 1-44 Addison Wesley).

Otro método preferido para determinar la similitud e identidad de secuencias es mediante el uso del programa EMBOSS Matcher y el algoritmo de Waterman-Eggert (alineación local de dos secuencias; [Schoniger y Waterman, Bulletin of Mathematical Biology 1992, Vol. 54 (4), págs. 521-536; Vingron y Waterman, J. Mol. Biol. 1994; 235(1), p1-12.]). Se pueden usar los siguientes sitios web: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html> or <http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/matcher>. Las definiciones de los parámetros utilizados en este algoritmo se encuentran en el siguiente sitio web: <http://emboss.sourceforge.net/docs/themes/AlignFormats.html#id>.

Preferiblemente, se usan los ajustes predeterminados (Matriz: EDNAFULL, penalización por hueco: 16, penalización por extensión: 4). El programa Emboss Matcher proporciona los mejores alineamientos locales entre dos secuencias, pero también se proporcionan alineamientos alternativos. La Tabla 2 describe los mejores alineamientos locales entre dos exones diferentes, preferiblemente exones de distrofina, que se usan preferiblemente para el diseño de oligonucleótidos. Sin embargo, también se pueden identificar alineamientos alternativos y, por lo tanto, regiones de identidad alternativas entre dos exones y utilizarlos para el diseño de oligonucleótidos, lo que también forma parte de esta invención.

A lo largo de la solicitud, las palabras "une", "dirige", "hibrida" podrían usarse indistintamente cuando se usan en el contexto de un oligonucleótido que es complementario inverso con respecto a una región de un pre-ARNm como se identifica en la presente memoria. De manera similar, las expresiones "puede unirse", "puede dirigirse" y "puede hibridarse", pueden utilizarse indistintamente para indicar que un oligonucleótido tiene una secuencia determinada que permite la unión con, el direccionamiento a, o la hibridación con, una secuencia diana. Siempre que en la presente memoria se defina una secuencia diana o una secuencia conocida en la técnica, el experto en la técnica puede construir todas las estructuras posibles de dicho oligonucleótido, utilizando el concepto de complementariedad inversa. A este respecto, se entenderá que, entre el oligonucleótido de la invención y las secuencias diana en el primer y/o segundo exón, es permisible un número limitado de emparejamientos erróneos o huecos en la secuencia, siempre que la unión no se vea afectada, como se indicó anteriormente. Por tanto, un oligonucleótido que puede unirse a una secuencia diana determinada, puede considerarse como un oligonucleótido que es complementario inverso con respecto a esa secuencia diana. En el contexto de la invención, "se hibrida" o "puede hibridarse" se utiliza en condiciones fisiológicas en una célula, preferiblemente una célula humana a menos que se indique lo contrario.

Como se emplea en esta memoria, "hibridación" se refiere al emparejamiento de compuestos oligoméricos complementarios (p. ej., un compuesto antisentido y su ácido nucleico diana). Si bien no se limita a un mecanismo particular, el mecanismo más habitual de emparejamiento implica enlaces de hidrógeno, que pueden ser enlaces de hidrógeno de Watson y Crick, de Hoogsteen o de Hoogsteen inversos, entre bases complementarias de nucleósidos o nucleótidos (nucleobases). Por ejemplo, la base natural adenina es nucleobase complementaria a las nucleobases naturales timina, 5-metiluracilo y uracilo que se emparejan a través de la formación de enlaces de hidrógeno. La base natural guanina es una nucleobase complementaria a las bases naturales citosina y 5-metilcitosina. La hibridación puede producirse bajo diversas circunstancias.

De manera similar, la "complementariedad inversa" se utiliza para identificar dos secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse entre sí, aunque una de las secuencias está orientada de 3' a 5' y la otra en la dirección inversa, es decir, de 5' a 3'. Por tanto, un nucleósido A en una primera secuencia de nucleótidos puede emparejarse con un nucleósido A* en una segunda secuencia de nucleótidos, a través de sus respectivas nucleobases, y un nucleósido B, localizado en la posición 5' del nucleósido A mencionado anteriormente en la primera secuencia de nucleótidos, puede emparejarse con un nucleósido B*, que se localiza en la posición 3' del nucleósido A* mencionado anteriormente en la segunda secuencia de nucleótidos. En el contexto de la presente invención, la primera secuencia de nucleótidos es normalmente un oligonucleótido de la invención, y la segunda secuencia de nucleótidos parte de un exón de un pre-ARNm, preferiblemente el pre-ARNm de distrofina. Se dice que, un oligonucleótido es, preferiblemente, inversamente complementario a una región de un exón (primer y/o segundo exón) cuando dicho oligonucleótido es al menos 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 % inverso complementario con dicha región de dicho primer y/o segundo exón. Preferiblemente, la complementariedad inversa es al menos de 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %.

Dentro del contexto de la invención, los excipientes incluyen polímeros (p. ej., polietilénimina (PEI), polipropilénimina (PPI), derivados de dextrano, butilcianoacrilato (PBCA), hexilcianoacrilato (PHCA), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), poliaminas (p. ej., espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), quitosano, poli(amido aminas) (PAMAM), poli(éster amina), éter polivinílico, polivinilpirrolidona (PVP), ciclodextrinas de polietilenglicol (PEG), ácido hialurónico, ácido colomínico y sus derivados), dendrímeros (p. ej., poli(amidoamina)), lípidos {p. ej., 1, 2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), cloruro de dioleoil-dimetilamonio (DODAC), derivados de fosfatidilcolina [p. ej., 1, 2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC)], derivados de lisofosfatidilcolina [p. ej., 1-estearoil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina (S-LysoPC)], esfingomielina, 2- 3-[Bis-(3-amino-propil)-amino]-propilamino]-N-ditetradecil carbamoil metilacetamida (RPR209120), derivados de fosfoglicerol [p. ej., sal sódica de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol (DPPG-Na), derivados del ácido fosfaticídico sal sódica del [ácido 1, 2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfaticídico, (DSPA), derivados de fosfatidiletanolamina [p. ej., dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 2-difitanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPhyPE).], N-[1-(2, 3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), N-[1-(2, 3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), 1,3-di-oleiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida (DOSPER), (1, 2-dimiristiloxipropil-3-dimetilhidroxietilamonio (DMRIE), (N1-colesteriloxicarbonil-3, 7-diazanonano-1, 9-diamina (CDAN), bromuro de dimetiloctadecilamonio (DDAB), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC), (trihidrocloreuro de N-palmitil-N-oleilamida del ácido b-L-arginil-2,3-L-diaminopropiónico (AtuFECT01), derivados de N,N-dimetil-3-aminopropano [p. ej., 1,2-distearoiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DSDMA), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetil-3-aminopropano (DoDMA), 1,2-dilinoleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 2,2-dilinoleil-4-dimetilaminometil [1, 3]-dioxolano (DLin-K-DMA), derivados de fosfatidilserina [1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina, sal de sodio (DOPS)], colesterol}, proteínas (p. ej., albúmina, gelatinas, atelocolágeno) y péptidos (p. ej., protamina, PepFects, NickFects, poliarginina, polilisina, CADY, MPG).

Dentro del contexto de la invención, los grupos conjugados se seleccionan del grupo que consiste en residuos de direccionamiento, residuos que mejoran la estabilidad, residuos que mejoran la absorción, residuos que mejoran la solubilidad, residuos que mejoran la farmacocinética, residuos que mejoran la farmacodinámica, residuos que mejoran la actividad, moléculas y fármacos indicadores, en donde estos residuos pueden ser péptidos, proteínas, hidratos de carbono, polímeros, derivados de etilenglicol, vitaminas, lípidos, residuos de polifluoroalquilo, esteroides, colesterol, residuos fluorescentes y residuos marcados radiactivamente. Opcionalmente, los grupos conjugados pueden protegerse y pueden conectarse directamente a un oligonucleótido de la invención o a través de un enlazador divalente o multivalente.

Los grupos conjugados incluyen residuos que mejoran el direccionamiento, la absorción, la solubilidad, la actividad, la farmacodinámica, la farmacocinética, o que disminuyen la toxicidad. Como ejemplos de dichos grupos se incluyen péptidos (p. ej., glutatión, poliarginina, péptidos RXR (véase, p. ej., *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 525), poliornitina, TAT, TP10, pAntp, polilisina, NLS, penetratina, MSP, ASSLNIA, MPG, CADY, Pep-1, Pip, SAP, SAP(E), Transportan, buforina II, polimixina B, histatina, CPP5, NickFects, PepFects), vivo portadores, proteínas (p. ej. anticuerpos, avidina, Ig, transferrina, albúmina), hidratos de carbono (p. ej. glucosa, galactosa, manosa, maltosa, maltotriosa, ribosa, trehalosa, glucosamina, N-acetilglucosamina, lactosa, sacarosa, fucosa, arabinosa, talosa, ácido siálico, ácido hialurónico, ácido neuramidínico, ramnosa, quinovosa, galactosamina, N-acetilgalactosamina, xilosa, lixosa, fructosa, manosa-6-fosfato, 2-desoxirribosa, glugal, celulobiosa, quitobiosa, quitotriosa), polímeros (p. ej., polietilenglicol, polietilénimina, ácido poliláctico, poli(amidoamina)), derivados de etilenglicol (p. ej., trietilenglicol, tetraetilenglicol), vitaminas hidrosolubles (p. ej. vitamina B, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B9, B12, C), vitaminas liposolubles (p. ej., vitamina A, D, D2, D3, E, K1, K2, K3), lípidos (p. ej., palmitilo, miristilo, oleilo, estearilo, batilo, glicerofosfolípido, glicerolípido, esfingolípido, ceramida, cerebrósido, esfingosina, esterol, prenol, erucilo, araquidonilo, linoleilo, linolenilo, araquidilo, butirilo, sapeinilo, elaidilo, laurilo, behenilo, nonilo, decilo, undecilo, octilo, heptilo, hexilo, pentilo, DOPE, DOTAP, terpenilo, diterpenoide, triterpenoide), residuos de polifluoroalquilo (p. ej., perfluoro[1H, 1H, 2H, 2H]-alquilo), fármacos autorizados de PM < 1500 Da que tienen afinidad por proteínas específicas (p. ej., AINE (antiinflamatorios no esteroides) tales como ibuprofeno (se describen más en la patente de Estados Unidos 6 656 730), anti-depresivos, antivíricos, antibióticos, agentes alquilantes, amebicidas, analgésicos, andrógenos, inhibidores de ECA (enzima convertidora de angiotensina), anorexígenos, antiácidos, antihelmínticos, antiangiogénicos, antiadrenérgicos, antianginales, anticolinérgicos, anticoagulantes, anticonvulsivos, antidiabéticos, antidiarreicos, anti-diuréticos, antidotos, antifúngicos, antieméticos, antivértigo, antigotosos, antigonadotrópicos, antihistamínicos, antihiperlipidémicos, antihipertensivos, antimaláricos, antimigrañosos, antineoplásicos, antipsicóticos, antirreumáticos,

antitiroideos, antitoxinas, antitusivos, ansiolíticos, anticonceptivos, estimulantes del SNC, quelantes, agentes cardiovasculares, descongestionantes, agentes dermatológicos, diuréticos, expectorantes, agentes de diagnóstico, agentes gastrointestinales, anestésicos, glucocorticoides, antiarrítmicos, inmunoestimulantes, inmunosupresores, laxantes, leprostáticos, agentes metabólicos, agentes respiratorios, mucolíticos, relajantes musculares, neutracéuticos, vasodilatadores, trombolíticos, uterotónicos, vasopresores), compuestos naturales de PM < 2000 Da (p. ej., antibióticos, eicosanoides, alcaloides, flavonoides, terpenoides, cofactores enzimáticos, policétidos), esteroides (p. ej., prednisona, prednisolona, dexametasona, lanosterol, ácido cólico, estrano, androstano, pregnano, colano, colestano, ergosterol, colesterol, cortisol, cortisona, deflazacort), triterpenoides pentacíclicos (p. ej., ácido 18β-glicirretínico, ácido ursólico, amirina, carbenoloxona, enoxolona, acetoxolona, ácido betulínico, ácido asiático, eritrodio, ácido oleanólico), poliaminas (p. ej., espermina, espermidina, putrescina, cadaverina), residuos fluorescentes (p. ej., FAM, carboxifluoresceína, FITC, TAMRA, JOE, HEX, TET, rodamina, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, CW800, BODIPY, AlexaFluors, Dabcilo, DNP), moléculas indicadoras (p. ej., acridinas, biotina, digoxigenina, residuos marcados con (radio)isótopos (p. ej., con ²H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O, ¹⁸F, ³²P, ³⁵S, ⁵⁷Co, ^{99m}Tc, ¹²³I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁵³Gd)) y combinaciones de los mismos. Dichos grupos conjugados pueden estar conectados directamente a los compuestos de la invención, o a través de enlazador. Este enlazador puede ser divalente (produciendo un conjugado 1: 1) o multivalente, produciendo un oligómero con más de un grupo conjugado. En la técnica se conocen procedimientos para acoplar dicho grupo conjugado, ya sea directamente o a través de un enlazador, al oligómero según la invención. También en el contexto de la invención se incluye el uso de nanopartículas con las que los oligonucleótidos de la invención están unidos de manera covalente, hasta tal punto que dicha construcciones se denominan ácidos nucleicos esféricos (ANE), como se describe, por ejemplo, en *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 12192 (Hurst et al.).

En este documento, y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para dar a entender que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los artículos no mencionados específicamente no están excluidos. Además, el verbo "consistir" puede reemplazarse por "consistir esencialmente en" que significa que un oligonucleótido o una composición, como se define en la presente memoria, puede comprender uno o más componentes adicionales que los identificados específicamente, no alterando dicho uno o más componentes adicionales la característica exclusiva de la invención. Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "uno/a" no excluye la posibilidad de que haya más de uno de los elementos, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "uno/a" generalmente significa "al menos uno/a".

Cuando la palabra "alrededor" o "aproximadamente" se usa junto con un valor numérico (alrededor de 10) significa preferiblemente que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos el 1 % del valor.

Cada realización identificada en la presente memoria se puede combinar entre sí a menos que se indique lo contrario.

Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

35 Ejemplos

Tablas 1-3

Tabla 1. Lista de posibles combinaciones de exones en la transcripción del gen DMD, para las cuales el exón U (cadena arriba) tiene un marco abierto de lectura continuo con el exón D (cadena abajo) si los exones U+1 (un primer exón) a D-1 (un segundo exón), y cualquier exón entre ellos, se eliminan de la transcripción.

Primer exón ('U')	Segundo exón ('D')
1	8, 20, 22, 51, 53, 59, 62, 64, 65, 67, 76, 79
2	5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 61, 68, 70
3	6, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 61, 68, 70
4	9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 61, 68, 70
5	9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 61, 68, 70
6	12, 18, 44, 46, 55, 57, 63, 66, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78
7	20, 22, 51, 53, 59, 62, 64, 65, 67, 76, 79
8	11, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 61, 68, 70
9	13, 14, 15, 16, 17, 19, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 45, 47, 49, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 61, 68, 70

Primer exón ('U')	Segundo exón ('D')
49	52, 54, 56, 58, 60, 61, 68, 70
50	53, 59, 62, 64, 65, 67, 76
51	54, 56, 58, 60, 61, 68, 70
52	59, 62, 64, 65, 67, 76
53	56, 58, 60, 61, 68, 70
54	57, 63, 66, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78
55	58, 60, 61, 68, 70
56	63, 66, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78
57	60, 61, 68, 70
58	62, 64, 65, 67, 76, 79
59	68, 70
60	68, 70
61	64, 65, 67, 76, 79
62	66, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78
63	67, 76, 79
64	67, 76, 79
65	69, 71, 72, 73, 74, 75, 77, 78
66	76, 79
67	70
68	71, 72, 73, 74, 75, 77, 78
70	73, 74, 75, 77, 78
71	74, 75, 77, 78
72	75, 77, 78
73	77, 78
74	77, 78

Tabla 2. Lista de regiones de exones: tramos de secuencia con identidad o similitud de secuencia (parcialmente) alta (al menos 50 %) entre dos exones de distrofina diferentes, identificados como el mejor alineamiento por pares con la herramienta EMBOSS Matcher usando ajustes predeterminados (Matriz: EDNAFULL, penalización por hueco: 16, penalización por extensión: 4) (http://www.ebi.ac.uk/tools/psa/emboss_matcher/nucleotide.html). La omisión de estos exones, y preferiblemente de cualquier exón entre ellos, daría como resultado una transcripción de DMD en marco (como en la Tabla 1)

5

Exeones	Alineamiento con EMBOSS	SEQ ID NO
8	AGAUAGAAGUCCA . . AGUGAGAAAGUUA	17
19	AGUGAGAAAGUUA	18
8	ACCUAUCAGAAAG--AAGUCCAUCUUUAUUGUACA 	19
21	ACAAAUCUUUUAAAGCAAGUCUUUCUGAUGUCA	20
8	UUUGCCUCAAAGUGAG--CAUUGAAGCC 	21
50	UUUACUUCAAAGACUGAGGCAAGCAGCC	22
8	GAAGCCUCCAGGAAGUGGAA 	23
52	GCAACAAUGCAGGAUUUGGAA	24
8	CAAUGAGCAUUGAA 	25
58	CAAGAGGAUUGAA	26
9	CUAGCACAGGGAUA	27

ES 2 758 982 T3

10	. . . CAAGCACAAAGGAGA	28
9	GUCAGUCUAGCACAGGGAUUGAGAGAAC 	29
12	GACUGGCUAACAAAAACAGAGAAAGAAC	30
9	UCUAGCACAGGGAUUGAGAG 	31
13	UCUAGAACAGAACCAAGUCAG	32
9	ACACAGGCGUUUUGUCACCACCUCUGAC 	33
14	AGACAUCCUUCUCAAUUGGCAAGGCUUAC	34
9	UCUAGCACAGGGAUUGAGAGAA 	35
15	UUUAGUGCAUGGCUUUCAGAAAA	36
9	UAUGCCUACACACAGGCGUUAUGUCACCAC 	37
16	UAUUCACUCAAACAAGAU-CUUCUUUCAACAC	38
9	GAUUGAGAGAACUUC	39

18 GAUUAAGUGAACUUC	40
9	CACCACCUCUGACCCUACA 	41
20	CACCCCAUCAGAGCCAACA	42
9	CUUA-UGUCACCACCUCUGA 	43
22	CUUAGUCACCGACUAUGA	44
9	UAUGUCACCACCUCUG 	45
23	UAUCUCAGCACCACUG	46
9	CAGGGAUUG-AGAGAAUUCUUCOC 	47
25	CAGGAUUAUCAGACAA-UUCAGCCC	48
9	UAAGCCUGAUUCAAGACUUAU 	49
26	UAAGCCUCGAGA-AAGAUCUAU	50
9	ACCACCUCGACCCUACAC	51

27	ACUACCAAGUGGUCUCUGCAC	52
9		GGAAUUGAGAGAAUUCU	53
28		54
		GGAGCUGAGGAAAUUCU	
9		AGGGAUUGAGAGAAUUCUCCCU	55
		
29		AGGAACUUGAGACAUAUUCUGU	56
9		CAGUCUAGCACAGGAAUUGAGAGAAUUCUCCCUAAGCCUCGAUUC	57
		
30		CAGUCU-GCCCAGGAGACUGAAAAUUCU-UACACUUAUUCAGGAGUC	58
9		GGUCAGUCUAGCACAGGAAUUGAGAGAAUUCUUC	59
		
31		GAUCAGUUAGAA---GAAUUGAAGAAACAUAUIC	60
9		UUCUCCCUAAGCCUCUGAUUCAAGAGCUAUGCCUACA	61
		
32		UUUUCGAAACCGCCAAUUUUGAGCGGUCUACA	62
9		CCCUAAGC-CUCGAUUCAGAG	63

33	64
	CCCAAAGAAUUUGAUAAGAG	
9	GGGAUUGAGAGACUUCUCCCCUAAGCCUCGAUUCAGAGCUAUGCCUACACACA--GGCUG	65
	
34	GAGAAUUGCUGAAAUGU-CCCGUAAGAUGCAGGAAUAUGAUAUGUCUUGACAGAAUGGCUG	66
9	AGUCUAGCACAGGGAUUGAGAGACUU	67
	
35	AGAGUAUCACAGAGGUAAGGAGGCUCU	68
9	UCAGUCUAGCACAG----GGAU--AUGAGAGAA	69
	
36	UCAGGCUGACACACUUUGGAUGAUAUCAGAGAA	70
9	CAGUCUAGCACAGGGAUUGAGAGAAUUCUU	71
	
38	CAGUUUAAACUCA--GAUUAACAAAAAUUGC UU	72
9	CAGGCUGCUUAUGUC	73
	
40	CAGGCUGAUGAUCUC	74
9	CCACCUCUGACCC	75

41	. .		76
	CCAACUCAGAUC		
9	GAUUAUGAGAAUUCU		77
		
42	GAAGUGAACAACUUCU		78
9	GGGAUUAUGAGAAACU		79
		
44	GCGAUUUGACAGAUUCU		80
9	GUCAGUCUAGCACAGGGAUUGAGAGAACUUCU		81
		
46	GUCAGAAUUUCAAAAGAGAUUUAAAUGAAUUUGUU		82
9	UCCCCUAAGCCUCGA		83
		
47	UCCCAUUAAGCCCGAGA		84
9	GAUUCAGAGCUAUGCCU-ACACACAGG		85
		
48	GUUCCAGAGCUUUACCUGAGAAACAAG		86
9	GGUCAGUCUAG-CACAGGGAUUAUGAGAGAAACUUCU		87

49	<p> </p> <p>GUUCAAGCUAAACAACCGGAUGUGGAGAGAUUUU</p>	88
9	<p>CAGGGUCAGUCUAGCACAGGGGAUUGAGAGAACUU</p> <p> </p>	89
51	<p>CUCUGGAGAUUCAACCGGGCUUGGACAGAAACUU</p>	90
9	<p>CUACACACAGGCUG</p> <p> </p>	91
53	<p>CAACACAAUGGCUG</p>	92
9	<p>GUCUAGCACAGGGAUUGAGAGACUUCU</p> <p> </p>	93
57	<p>GUCU-GCACCUUUCUCUGSAGAACUUCU</p>	94
9	<p>CAGGCUCUUAUGUCACCAC</p> <p> </p>	95
59	<p>CAGGCUGAGGAGGUCAUAC</p>	96
9	<p>CAGCUCUGACCCUACA</p> <p> - . . . </p>	97
60	<p>CAGCUCUCACCGUAUA</p>	98
10	<p>UGAUGUGGAAGUGGAAAGACCAGUUUCAUCUCAUGAG</p>	99

1.2	. UGAUCUUGAAGACCUAAAACGCCAAAGUACAACAAUAAG	100
1.0	UCAACACAGCUUUAGAGAAGUA	101
1.3	. UCAAGAAGAUUCUAGACAAGAA	102
1.0	CAAAACAGCUUUAGAGAAGU-AUUUUCG-UGGCUUCUUU	103
1.4	. CAAAACUUCUGAUGGACACAGACAGCCGCCUGGGUUCUUU	104
1.0	ACAGCUUUAGAGAAGUAUUUUCGUGGCUUC	105
1.5	. AAAAGUCAAAUGAAAUGUUUAUCAAGUCUUC	106
1.0	AGUAAAACCCUGGACCGUUUCAAAACAGCUUUUAGAGAAGU	107
1.6	. ACUCAAAACAAGAUUCUUUCAACA-CUGAAGAAUAAGU	108
1.0	AUUUGAAGCUC-CUGAAGACAAGUCAUUUGGCAG	109
1.8	. AUUUGCAUCUUUCGGAAGGAAAGGCAACUUCUCAG	110
1.0	AUCAACA-CUUUAGAGAAGU	111

20 AUCAAACAAGCCUCAGAACAAACU	112
10	GACACAUGCAAGCA	113
22	. . . GACACUUUGCCACCA	114
10	UGAAGUAAGCCUGAGCCGUUAUCAACAGACUUUAGAAGAAGU	115
23 UGAAAUUAGCCGGAA---AUUAUCAAUCAAGAAUUUGAAGAAU	116
10	AAACCCUG-GACCCGUUAUCAAAACAGCCUUUAGAAGAAGUAUUAUC	117
25 AGACUUAGAGACAGAAACUCAAAAGAAACUUAACACUCACAGUGGGAUC	118
10	CUGCUGAGGACACAUUGCAAGCACAGGAGAGAU	119
26 CUCCAGAUGAAUUCACAGAAAGCAGUUGAAGAGAU	120
10	ACAGCUUUGAAGAAG	121
27 AGAGCUAAGAGAGG	122
10	AAACCCUGAGCCGUUAUCAACAGACUU--UAGAAGAAGUAUUAUCUGGCUUUCUUGCUGAGGACACAUUGCAAGC	123

28	10	124
10	125	
29	126	
10	127	
30	128	
10	129	
31	130	
10	131	
32	132	
10	133	
33	134	
10	135	

34 CUACAGAUUGAAUUGACAAGAGAGUCAG	136
10	AAACAGCUUUG--AAAGAUA . . .	137
35	AAACAGUUUGGGCAAGAAGGA	138
10	AAGCACAGGAGAGAUUCUAAUGA-UGUGGA 	139
36	AAACACAUGGAAACUUUGACCAGAAUGUGGA	140
10	GAAGUAAACCCUGGA . . .	141
37	GAAUUAGACUGGA	142
10	UGAAGUAAACCCUGGACGUUUCAAAACAGCCUUUAGAAGAAGU 	143
38	UGAAGGA--UUUGGACAGUUUAACUCAGAUUAACAACAAAAUU	144
10	AUUGAUGGAGAGUGAAGUAACCU 	145
39	AUUGUUCCAAGAGGAGACAACUU	146
10	UGAGCACAUUGCAAGCACAGG---AGAGUUUCUAUUGAUGGAAUGGUCUGCAAGA	147

40	<p> </p> <p>UGAGGUCUCAAAGAAAAAGGCCUCAGAAAAUUUCUCAUCA-GUGGUAUCAGUACAAGA</p>	148
10	<p>GCUGAGGACACAUUGCAAGCACAAAGGAGAGAUU-UCUAUAUGAUGGG</p> <p> </p>	149
41	<p>GCUGAAUGCAGUGCGUAGGCAAGCUCGAGGCGUUGUCUGAGGAUGGGG</p>	150
10	<p>CUGAAGACAAAGUCAUUUGGCAGUUCAUUGAUGGAGAGUGAAGAAACCGGACCUGUUAUCAAAACAGCUUU-AGAAGAAGUAUUUAUC-GUGG-----CUUCUUUCUGCUGAGGACACAU-UGC-//</p> <p> </p>	
42	<p>CUGAAGACAUG-CCUUUGGAAAUUUCUU-AUGUGCCUUUCUACUUA--UUUGACUGAAAUCACUCAUGUCACAGCCCUAUAAGAAGUGGAAACAACUUCUCAAUGCCUGACCUCUGUGCU//</p>	
151	<p>//AAGCACAAAGGAGAGAUUCU</p> <p> . . . </p> <p>//AAGGACUUUGA-AGAUCUCU</p>	152
10	<p>CGUUAUCAAACAGCUUUAGAAGAAUUAUC-GUGGCUUCUUUCUGCUGAGGACACAUGCAAGCACAAAGGAGAGAUUUCUAUUGAUGUGGAAAGUGGAAAGACCAGU</p> <p> </p>	153
44	<p>CGUUUCAAUUUGUAUA-AAGAUAUUUAUACAGUGGCUAACAGAAAGCUGA--ACAGUUUCUCAG-AAAGACACAAAUCUGAGAAUUGGGAAACAUCAAUAACAAU</p>	154
10	<p>AAGUAAACCUGGACCGU-UUACNACAGCUUUAGAAGAA---GUUUUAUCGUGG</p> <p> </p>	155
46	<p>AAGAAUUCUUGUCAGAAUUUCAAGAGAAUUAAAUGAAUUUGUUUUUUAUGGUUG</p>	156
10	<p>AAGCUUCUGAGACAAGUC</p>	157

47	. . . AAGCUAAGCAGACAAAUC	158
10	UGGAGCUCUGAAGACAAGUCAUUUGGCAGUU 	159
48	UUGAAGCUCA--AAUAAAAGACCUUUGGCAGCU	160
10	GAGAGUGAAGUAAAACCGUGACCGUUUAUCAACACAGCUUUAGAGAAGAUUAUUC 	161
49	GAAACUGAAAAGCAGUUCAAGCUAAAACAACCGGAUGUGGAAGAGAUUUUGUC	162
10	UUCAUUGAUGGAGAGUGAAGUAAACCGUGACCGUUUAUCAACACAGCUUUAGA-AGAAGUUAUUCG--UGGCUUUUUCUGCU-GAGSACACAUUGCAAGCACAAAGGAGAGAU 	163
51	UUCCUUGAUGUUGGAGGUACCGUCUGG-CAGAUUUUCAACCGGCUUGGACAGAAUCU--UACCGACUGGCUU-UCUCUCUUGAUCAGUUAUAAAACACAGAGGGUGAU	164
10	GAGAGAUUUUCU-AAUGAUGUGGAGUGGUGAAAAGACCAGUUUCAUA 	165
53	GAAAGAAUUCAGAAUCAGUGGGUAGAGUACAAGAACACCCUUCAGA	166
10	CAGCUUUAGAAGAA . .	167
55	CUGCUUUUGAAGAA	168
10	CAUUUGGAGCUCUGAAGACAAGU	169

15	<pre> UUUCAGAAAAGAAAGAUUGCAGU-GAACACAGAUUCACACAACUGGCUU----UAAAGAUCAAAUGA--AAUGUUUAUCAAAGUCUUCAAAAAC </pre>	182
11	<pre> AGAAAACUGAAGUACAAGACAGA-UGAAUCUCCUAAAUAUCAGAU </pre>	183
16	<pre> AGAAAAGCAUCCAUCCGGAACUCUAUCACUCAAA-CAAGAU </pre>	184
11	<pre> AGGAAAUAUCAGAAGAAGAAA </pre>	185
18	<pre> AGGCAACUUCACAGACUUAAGAAA </pre>	186
11	<pre> CGGGUUGUAUAUCUACAA-UUGGAAGUAAGCUGAUUGGAACAGGAAA-AUUUACAGAAGA </pre>	187
20	<pre> CCGGUAGUCAAUUCGCCAGUUGUAAGUGAGAGACUU--AACUGGCUGGAGUUCAGAACAA </pre>	188
11	<pre> CCAUCAGGGCCGGGU </pre>	189
22	<pre> . . . CCAUCAGGACAUGGGU </pre>	190
11	<pre> CUGAUUGGAACAGGAAAUU--AUCAGAGAUAGAAGAACUGAAGUACAAGACAGAGAUUGAAUCUCCU </pre>	191
23	<pre> CUGAAAUUAGCCGGAUAUCAAUCAGAAUUUAGAAGAUUGAGGGACGCCUGGAAGAGC-UCUCCU </pre>	192
11	<pre> GAUCAAGAAACUGAAGUACAAGACAGCAUGAUC </pre>	193

44	<pre> ACAGAGCUGAAGACAGUUUCUCAGA--AAAGACACAAAUUCUGAGAAUUGGAAUCAUCGUAUUUACAAA </pre>	230
11	<pre> GAAGUCAGAGCAGAGAAUUCUCUAAAUCAA </pre>	231
46	<pre> GAAGACAAAAGAAAUUCU-UGUCAGAAUUCAA </pre>	232
11	<pre> CAGAGUGAAGA--AACUGAGUACAG---AGCAGAUAAUUCUC </pre>	233
47	<pre> CAGAGGCGAAGAUAAACUUGRAAUAAGCUCAGCAGACACAAUUCUC </pre>	234
11	<pre> AACUGAAGUACAAG-AGCAGAUAAUUCUCUAAAUCUACAAGA </pre>	235
48	<pre> ACCUAGAAACAAGGAAAUUGAGCUC--AAAUAAAAGA </pre>	236
11	<pre> GGAACAGGAAAUAUCAGAGAAUGAAGAAACUGAAGUACAAGAG </pre>	237
49	<pre> GAAACUGAAAUAGCAGUUCAGCUAAACAAACCCGGAUGUGGAAAGAG </pre>	238
11	<pre> AUGAAUUCUURAAAUUCAAGUAGGAAUGCC </pre>	239
51	<pre> AGGAAUCUGCCAUUCUCAAACUAGAAAUGCC </pre>	240
11	<pre> GAAAAUUUCAGAAAGUAGAAACUGAAGUACAAGCA </pre>	241

17 ACAGACAACUGUAAUGGA	252
12	GUUACAAAAAC-AGAAAGAAACAAGG 	253
43	GUUACAAAAUUGUACRAGGCCGACAAGG	254
12	CAAAAAACAGAGAAAGAA-----CAAGGAAAUGGAGGAAG 	255
45	CAAAAAACAGAGCCAGUUAUCACAGGAAAAAUUG-GGAAG	256
12	UUACAUAGAGUUUUAUGGAUCUC-AGAAUCA 	257
54	UAAACAGAGAAUAUCAUUGCCUCUUGGAGAAGCA	258
12	GAUCUCCA----GAAUCAGAAACUGAAAAGUUGA--AUGACUGGCUA-ACAAAAACAGAAAGAAAGAAC 	259
56	GACCUCCAAGGUGAAAUUGAAGCUCACACAGAUUUUAUCACAACCGGAUGAAACAGCCAAAAAUAUC	260
13	UCACGCAACUCUGCUUUGGAAGACAA 	261
15	UCACACAACUG--GCUUA-AAGAUCAA	262
13	AAGAAGAUUAGAACAAAGACAAG	263

16 AAGCGAUCUAGAA-AAGAAAAAG	264
13	AAUCUAGUGGAGAUACAGCAACUGCU--GCUUUGAAGAAACAACUUA 	265
18	AAUCUUGGAGGAGGCAACUUCUCAGACUUA AAAAGAAAAAGUCA AUCUAGUGGAGAUACAG--CAACUGCUGCU	266
13	267
20	AACAUUGGAGCAGAUACAAACUACUGCU	268
13	AGUCAGGGUCAAUUCUC 	269
22	AGUCAGAAACCAACUCUC	270
13	GCUUCAAGAAGAUAGAACAAAGAAAGACAG-GGUCAAUUCUCAC 	271
23	GCUUUCAAAGUUCUCUG-CAAGACAACAAGUGGCCUUAUCUUC	272
13	ACAUGG-UGGUGGUAGUUGAUG 	273
24	AAAUGGUGGUGGAAAGUUGAUG	274
13	AGAAAGUCUAGACAGAAACAAGUCAGGU	275

25 AGAAAGUAAGAAAGUAAGAGCAGAGCCAGAGAGU	276
13	CUUCAAGAAGUCUA 	277
26	CUCCAGAAAGUCUA	278
13	UCAAGAAGUCUAGAACAAGACAAGUCAGGGUCAAUUUCUCACUCA 	279
27	UAAAGAAGAGCCCAACAAAAGAAAGCCAAAGUGAAACUCCUUACUGA	280
13	CAUGGUGGUGUAGUUG--AAUCUAGUGGAGACGCAAGCUGGCUUG--GAAGAACAACUUA 	281
28	CAUGUUGGCAUGAGUUUGUCUACAUCUUGGAGAAAGCAACAAGUG--GCUAUAUGAAGUGAAUUUA 	282
13	CAUGGUGGUGUAGUUGAUGA	283
29	CAUGGAAGCUAAUCAUGA	284
13	UCACUCACAGUGGUGUAGUUAUGAUAUCUAGUGGAGUC--ACGCAACU 	285
30	UCAUUGACACAGCAGUUGCCAGCUUUAU--AUUGCACACAGGUGGACGACCU	286
13	AGAAUAUCUAGAACAAGACAAGUCAGGG	287

38		300
	AUCUGAAAAGAGGAAAGACUUA		
13	GAUGAAUCUAGUGGAGAUACGC--AACUGUCUUUGGAAGA-ACAACUAAA		301
	.. .		
39	GAGAAAGCGAGAGAAUAAGAUAAAACAGCAGCUGUUAACAGACAAAACAUAA		302
13	AGAUCAAGACAAGACAAGUCAGGGUC---AAUUCUCACUCACAUGGUGGUAGUUAUAUCUAGUGGA-GAUCACGC-AAUCUGCU		303
	.. .		
40	AGGUCUCAAAGAAAGAAAA---AGGCUCUAGAAAUUUCUA-UCA----GUGGUUAUCAGUACAAGAGGCAGGUCUGAUCUCCUGAAAUUCU		304
13	AGUGGAGUACAGCGCAACUCUGCUUUGGAAG		305
		
41	AGUGGAGCCAAUCUCAGAUCCAGCUCAGCAAG		306
13	UGAUGAAUCUAG--UGGAGAUACAGCAACUGGUCG-UUUGGAA		307
		
42	UGAAGAAACGAUGAUGGUGAUGACUGAAGACAUCCUUUGGAA		308
13	AGUUGAAUUAUGUGGAGAUCA----CGCAACUGCUGCUUUGGAAGA-ACAACUU		309
		
44	AGAUAUUUAUC-AGUGGCUAACAGAGCUGAAGACAGUUUCUCAGAAAAGACACAAAUU		310
13	CUUCAGAAAGAUUAAGAAACAG		311

46	. . . CUAAAAGAAAAGCUUGAGCAAG	312
13	GUGCUUCAAGAAAUU--AGAACRAGAACAGU 	313
47	GUGCUCCAUUAGGCCAGAGAGAAUUAACU	314
13	AGUGGAGUACACGCAACUGCUUUUGG 	315
48	AGACAGUUAAAUCUUCUGCUUGG	316
13	UAGAACAAGAAAGUCAG . . .	317
49	UUGUACAAGGAAAAAACCAG	318
13	GGUCAUUCUCUCAUGGUGGUAGUGAAUCUAGUGGAGUACCGCAACUGCUUGGAGAA 	319
51	GAUCAAGUUUAAAAUCACAGAG--GGUGAUGGUGGUGAC-CUUGAGGAUUAACAACGAGAUCAUCAACAGAA	320
13	GAUCUAGAACAGACA . .	321
53	GAUGAAGUACAAGACA	322
13	GCUCUUGGAGAA	323

18	. UCCUGAAUUUGCAA--UCUUUCGGAAGGA	335
14	CAAUUGGCAACGUCUUACUGAAGA 	336
20	CAGAUACAAC-UACUGUGA CAGAUACAAC-UACUGUGA	337
14	UAUUGGAGAUUGGCAACAUUCUGAUGG 	338
22	UAUCAGGACC-AUGAGUC-CAUCAGGACUUGG UAUCAGGACC-AUGAGUC-CAUCAGGACUUGG	339
14	UUUACAAGACAUCUUCUCAAUGGCAAC 	340
23	UUUACAA-AGUUC--UCUGCAAGCAAC UUUACAA-AGUUC--UCUGCAAGCAAC	341
14	AAGACAUCUUCUCAAUUGGCAACGUCUUCUGAAGAA 	342
24	AAGAAUUGGAGUCUAGGAGUUGAUGUUUUUCUGAAGGA AAGAAUUGGAGUCUAGGAGUUGAUGUUUUUCUGAAGGA	343
14	UGUAGAUGGACAGA 	344
25	UGAGGUGGGCAGAGA UGAGGUGGGCAGAGA	345
14	AAUUGCAACGUCUUACUGA AAUUGCAACGUCUUACUGA	346

27	347
	AAAGUGAAAACUCCUUACUGA	
14	GCAAACAUCUG--UAGAUUGGA	348
	
28	GCAAACAAGUGGCUAAAUGAA	349
14	AUCGAUGGGCAA	350
	. . .	
29	AUGGAUGAGCUAA	351
14	CAGAAAGACCCUGGUUUUUAACAAG	352
	
30	CAGGAGUCCUCACAUUCAUUGACAAG	353
14	UUUUACAAGACAU	354
	. .	
31	UUUGACAAGUCAU	355
14	UGUAGAUGGACAGAAGA	356
	
32	UUUAGAUGAAGUGAAGA	357
14	AACGUUUUACUGAAG	358

33	. . . AAAUCUCUGAGUGAAG	359
14	AAAUGGCAACGUCUU-ACUGAA . .	360
34	AAAUG--AAUGUCUUGACAGAA	361
14	CAGAGACCGCGGUCUUUUU 	362
35	CAGAGAGUGGUAAAUCUUUU	363
14	CAAUUGGCAACGUCUUAC 	364
36	CACAUGGAAACUUUUGAC	365
14	AUCGAUGGCAACAUUCUGUAGUAGACAGAGACCG 	366
37	AUCGAUUUGAGCCAUUUC-ACACAGAAUUAGACUG	367
14	UCUCAAAUGGCAACGUCUUACUGAAGA 	368
38	UCUGAAAGAGGAGACUUCAAUAAAGA	369
14	GAAAGCCGCGGUCUUUUACRAGACAUCCUUCUCAAUUGGCAACGUCUUC	370

39	371
	GAAGACAUCAGGGUACUGUAAAAGA-AUUGUUCGAAAGAGAGACACUUC	
14	AGGUCUUCUGAAGAACA	372
	. . .	
40	AGGUCUCAAAGAAAGAAA	373
14	GGGGAUCGAGGGCAAA	374
	. .	
41	GGGAAAUUGA-GAGCAA	375
14	AAAGCAU-CCUUCUCAAU	376
	
42	AAAGCAUGCCUUUGGAAU	377
14	AAUUGCAACGUCUUCUGAAGA	378
	
44	AAUUGGGGGUUUCAUUAUGA	379
14	UAGAUGGACAGAAGA	380
	. .	
46	UAGAAGACAAAGA	381
14	UUCUCAAUUGCAACGUCUUCUUCAGAAC	382

23	<pre> AAUAGCGGAAAUUAUCAUACAGAAUU </pre>	407
15	<pre> UUCAGAAAAAGAGAUG---CAGUGAACAC UUCUAAAAAGCAGCUGAACACAGUCGACA </pre>	408
24		409
15	<pre> UUUUAGUGCAUGGCUUUCAGAAAAAGAGAUGCAGHGAACA-AGAUCACACAACUGGCUUUAAAAGAUCAA-AAUGAA </pre>	410
25	<pre> UUUUAGUCAGUGAUUUCAGACAUAUCAGCC-CAGUCUAAACAGUGUCAUAUGAAGGGGCGAGAAUAAGAAGAUAGAA </pre>	411
15	<pre> AUGGCUUUCAGAAAAAGAGAUGCAGUGAACAAAG </pre>	412
26	<pre> AUGAAUUCAGAAAA--GCAGUUAGAGAGAAUGAAG </pre>	413
15	<pre> AGAAAAAGAGAUGCAGUGAA </pre>	414
27	<pre> ACAAAAAGAGCGAAAGUGAA </pre>	415
15	<pre> CACACAACUGGCUUUAAGAUCAAAAUAUGAAUUGUUUAUCAAGUCUCAAAAACU </pre>	416
28	<pre> CAAAACAGGGCUAAAUGAAAGUAGAAUUUAACUUAAAAACCAACUGAAACAAUU </pre>	417
15	<pre> AGAGAGUCAGUGAACAGAUUCACACA </pre>	418

35	431
	UGAGAAAAGAGGUGCACCUGAAGAGUACACAGA	
15	UGCAUGCCUUCAGAAAAGAGAUGCAGAACAAAGA	432
	
36	UGGAUAAUCAGAGAAAAGAAACCCAGCAAA-AAAGA	433
15	UUUAAGAUCAAUUGAA	434
	
37	UUUAAGGCAGAACUGAA	435
15	UGCAUGCCUUCAGAAAAGAGAUGCAGUG-AACA-AGAUUCACACAACUGGUUUA	436
	
38	UCCAUUCCUUU--GAAGGAUUGGAGCAGUUUACUCAGAUUACAAAAAUUGCUUGAA	437
15	UCAGAAAAGA-AGAUCCAGUGAACAGAUCACACAACUGCCUUUAAAGAUCAAAUCAAUUAUCAAAG	438
	
39	UGAGAAAAGGCAGAGGAUUAAGA---UAAAACAGCAGCUGUUAACAGA-CAAAACAUAUUGCUCUCAAG	439
15	AAAGAGAUGCAGUCAAGA---UUCACACAACUGCCUUUAAAGAUCAAAUUAUCAAGUCUCAAACAAACUGG	440
	
40	AAAGAAAAGGCUCUAGAAAUUUCUCAUCAGUGUAUC--AGUACAAGAGGCAGGCUAGAUCCUGAAAUGCUUG	441
15	UUUCAGAAAAGAGAUGCAG-UGAA	442

41	<p> </p> <p>UUGCAGAAAGAAGAAAGAGGAGGUGAA</p>	443
15	<p>GGUUUAAAAGAU</p> <p> . . </p>	444
42	<p>GACUUUGAAGAUC</p>	445
15	<p>UUUUAGUGCAUGGCCUUUCAGAAAAAGAAGAUGCAGUGACAAGAUUCACAACUG-GCUUUA--AAGAU-CAAAAUG-AAUUGUUUUAUC</p> <p> </p>	446
44	<p>UAUUUAUCAGUGGCCUAACAGAAAGCUGAAACAGUUUCUCAGAAAAGACACAAAUCUGAGAAUUGGGAAACAUUUACAAAUGGUAUC</p>	447
15	<p>AAGAUCAAAUGAAAUGUUUUAUCAAGUCUUCAAAA</p> <p> </p>	448
46	<p>AAGAACAAAGAUAUCUUGUCAGAAUUCAAAAGA</p>	449
15	<p>AAGAUCAAAUCAA-UGUUUAUCAAGUCUUCAAA</p> <p> </p>	450
47	<p>AAGAUAACUUUAAAUAAGCUCAGCAGACAAA</p>	451
15	<p>GCUUCAGAAAAAGAGUAGCAGUAA</p> <p> </p>	452
48	<p>GCUUCAGACCUUGAAGA-GCAGUUA</p>	453
15	<p>GAAAAAGAGAUUCAGUAGAAACAAGAUAUCACACAACUUGCCUUU</p>	454

60 UCUGAAAAGAGAGACGUG	467
16	AAAAGAAAAG--CAAU 	468
18	AAAAGAAAAGUCAAU	469
16	UAAGUCAGUGACCCAGAAAGACGGAAGCUGGUAACUUUGCCCGGUGGGUAUUUUACUCCAAAAACUUGAAAAGAGUACAGC 	470
20	UAAGUGAGAGACUUACUGGUGGAGUAU--CAGAACAAAU--CAUCGCUUUUAUAUCAGGUCACAAAUUGGAGCAGAUAGACAAC	471
16	AAGUCAGACCCAGAAAGACGGAAGCAUGG 	472
22	AACUUAGUCACCGACUAUGAAAUAUGG	473
16	AAAAGCAUCCAUUGGGCAAAACUGUAUUCACUCAAAACAAGAU 	474
23	AAAAGCUA--GAGGAGCAA--UGAAUAAACUCCGAAAAAUUC	475
16	ACCCAGAGACGGAAGCAUGGCUGGA 	476
24	ACCCUGAGAA--AUGGAGGUCUGAA	477
16	AAGCGGAAGCAUGGCUGGAUAACUUUGCCCGGUGGGUAUUUUAGUCCAAAAACUUUGAAA	478

31	491
	AGAAAUGAAGAAACAUAUAUCAGGGGAA	
16	UUAGUCCAAAAAC	492
	. .	
32	UUUUCAGAAAC	493
16	CCAAA-AACUUGA--AAAAGUA-CAGC	494
33	CCAAAGAACUUGAUGAAAGAGUAACAGC	495
16	GGAUUCUAGAAAAGAAAAGCAUC	496
	
34	CAGAUUGGAAUUGACAAAAAGAGAU	497
16	GGUUCAGAAAAGRAAAAGCAUCC	498
	
36	GGAUCAUCAGAGRAAAAGAAACCC	499
16	AAAAGCGA-UCUGAAAAGAAAAGCA--AUCCRUG--GGCAAAUCUG	500
	
37	AAAGGACUCUACACGUGACCAAGCAGCAAAACUUGAUGGCAACCG	501
16	AUCACUAAAACAGAUUCUUCUAACACUGAAGAU--AAGUCAG	502

38	503
16	ACUCAGAAUACAAAAAUUGCUUGAACACACUGAGGCGUAAAAUCAG AACUGUAUUCACUCAAACAGAU-CUUCUUUCACACUGAAGAAUAAGUCAGUGA	504
39	505
16	AAAAAGGCGUUCAGAAA AAAAAGGCGUUCAGAAA	506
40	AAAAAGGCGUUCAGAAA	507
16	CAGAAGACGGAAAGCAUGGCGUUGAU 	508
41	CAGAAGAAAGAAAGAGGAGCUGAAU	509
16	ACUGUAUUCACUCA 	510
42	ACUGAAAUACUCA	511
16	ACUGAAGAAUAAGUCAGUGACCAGAA-GACGGAA 	512
44	ACAGAACGUGAA--CAGUUUCUCAGAAAGACACAA	513
16	AAAAAGGCGUUCAGAAAAAGAAAAGC	514

46	515
	AAAAGAGCAGCAACUAAAAGAAAAGC	
16	AAAAACUUGAAAAGA	516
	.	
47	AUAAAACUUGAAAUA	517
16	AGCAAUCCADGGGCAACUGUAUCACUCAAAC-AAAGA	518
	
48	AGAAUCAGUUGGAAAUUUUAUAAACCAACCAAACCAAGA	519
16	UUUCACACUGAAGAAUAAAGUCAGUCGCCAG	520
	
49	UUUGUACAAGGAAAAAACCAGCCACUCAGCCAG	521
16	GCAAACUGUAUUCACUAACAAGAUUUUUUUCACACUGAAG	522
	
51	GGAAUCGCCAUCUC-CAAACUAGAAUAGCCCAUUCUCCUUGAUG	523
16	AAAGAAAAAGCAUCCAUUGGCAAA	524
	
53	ACAGUAGUAGCAUCCAAAAGAAAA	525
16	GAAGAAU--AAAGUCAGUAGCCCAAGAAAGCGAAGCAUGGC	526

22	. . CCACCAAUGGCCUAUCA	539
17	CACCACCUCCTCCAAAAGAAGAGGCGAGAUUACUGUGGAUUCUGAAAAUAG 	540
23	CAGCACACUGUGAAAAGA-GAUGUGGAAAGAAAAGGCCCCUCUGAAAUAUG	541
17	UGUGGAUUUCGAAAUAUAGAAAA 	542
24	UGGGGAUUCAGAAAUAUCUAAAAA	543
17	AAACAGU---AACUACGGUGACCACAAGGGAA 	544
25	AAACAGUCUAUGAAGGUGGGCCAGAGAUA	545
17	AAGAGGAUCUCCACCACCACCCUCCCCCAAAAAGAGAGGC 	546
27	AAAAGGAUCUUGAAAACUCUAACCACCAACUACCCAGUGGC	547
17	AACACAGAACUG--UAAUGGAAAACAGUAAACUACGGUCCACCAAGGAAACAGAU-CCUGUAAGC 	548
28	AAAAGCAACAAGUGCCUAAAUGAAGAUAUAACUUAAAACCAACUUGAAAACAUAUCCUGGCGGAGC	549
17	UCCUGUAAGCAUGCUCAA-GAGGAACUU	550

29	551
	UCAUGGAGAGC-UAAUCAUAUGAGGAACUU	
17	AAAAAGAGGCAGAUUACUGUGGAUUCUGAAA	552
	
30	AACAGACAUCACAGUCUGCCAGGAGAGACUGAAA	553
17	AGGGAACAGAUCCUGGUAAGCAUGCU	554
	
31	AGAAACAUAACAGGGAGAGGCGCU	555
17	CUGUAAUGGAAACAGUAACUACGGUGACCACAAGG-GAACAGAUCCUGGUAAGCAU	556
	
32	CUGCAUUGGAAACAAGAGUGGCA-ACAGGAGUAGUACAGUCACAGCUAAAUCAU	557
17	AGAAAGGCAGAUUACUGUGAUUCUGAAAUUAGGAAAAG	558
	
33	AUAAAAGUCUGAGUGAAGUGAAGUCUGAAGU--GGAUAUG	559
17	AGCAGAUUACUGUGGAUUCUGAAAUU	560
	
34	AUGCCUAGUAAUUUGGAUUCUGAAGUU	561
17	CACCUCCCCAAAAGAGAG	562

35 CACUCCCGAGCAGAAGAG	563
17	CCAAAAGAAGAGG . .	564
36	CAAAAAGAAGAGG	565
17	CAGACAACUGUAAUGGAAACAGUAACUACGGUGACCAC 	566
37	CAGCAACU-UGAUGGCAA-----ACCGGGUGACCAC	567
17	UGGAUUCUGAAUU ..	568
38	UGGAGGCUGAAUU	569
17	AAAAGAAGGCAGAUUACUGUG--GAUUCUGAAUUAGGAAAG 	570
39	AAAAGAGACAACUUACAACAAGAAUCACAGAUAGAGAAAG	571
17	CAAAAAGAGCAGAUUACUGUGAUUCUGAAUU 	572
40	CAGUACAAGAGCAGCUGAUCAUC-UCCUGAAUU	573
17	CAGAUCCUGUAAAAGCAUCCUCAAGAGAA	574

		611
22	UCAGGAGAC--CAUGAGUGCCAUCAAGGACA		
19	AGCGAARAAGC--UCAGAAUUCAGARAACUGCAAGAUCCAGACAGAUCAAGCUCAGGCC--CUGGUGAACA		612
		
23	AGCCGAAAUAUCAUACAGAAUUGAAGARAUUGAGGACGCGUGGAAGACUCUCCAGCAGGUGGUAGCA		613
19	AUCAGCU-CAGGCCUUGGAAACAGAUGG-UGAA		614
		
24	AUCACUAACAACCCUCAGAAUUGGAUUGGCUGAA		615
19	AGAGCGAAGAAAGCUCAGAGA-AGUUCAGAAA--ACUGCAAGA		616
		
25	AGAGCCAGAGUUUGCUUGAGAGCUCUGAGACAGAAACUCAAGA		617
19	GCCAUAGAGCGAAGAAAGCUGAGAAGUUC--AGAAAACUGCAAGAUCCAGCA-GAUC-AGCUCAG--GCCUGGUGGA--ACAGAUGGUGAA		618
		
26	GCCAGAAAG-GAGGCCUUGAAGGAGGUUGGAGAAAACUGUAAGCCUCCAGAAAAGUAUCAGAGAUCCGAAUGGAUGACACAAGCUGAA		619
19	AGCUGAGAGUUCAGAAAACUCGCAAGAU		620
		
28	AGCUGAGAAAUCUCUGAGGUGCUAGAU		621
19	AGAUGCCAGAGAUCAAGCUCAGGCCUUGGAAACAGAUGGUA		622

42 GUGAACAACUUCUAUG	647
19	CAUAGAGCGAGAAAAGCUGAGAGUUCAGAAAACUGCGAAGUCCA 	648
44	CAGAAAACACAAAUUCUGAGAA-UUGGAAACA-UGCUAAAUCAA	649
19	AGAAAAAGCUGAGAGUUA 	650
46	AGAAAAGCUUGAGCAAUUA	651
19	AGAAUUCAGAAAACUGCGAAGU-CCAGCAGAUCAAGCUCAGGC 	652
47	AUAAGCCAGAAAG--GCAAGAUAAACUUGAAAUAAGCUCAAGC	653
19	AGCAGAUCA-GCUCAGGCCUUGG---UGGAACAGAUUGUG 	654
49	AGCAGUUCAGCUAAACCCGGAUGUGGAAAGAUUUUG	655
19	GAAAAAGCUGAGAGUUCAGAAAACUG-CAAGAUGCCAGC 	656
53	GAAAGAGCUGAGAGUUCAGAAAACUG-CAAGAUGCCAGC	657
19	AGAAUUCAGAAAACUGCGAAGUCCAGCAG	658

26	. . AGAAAGAUCUAUCAGAGA	683
21	CUGAAGAGAAAGGACAAG . . .	684
27	CUGA AUGGAAAUG-CAAAG	685
21	AUUAAAAUUCAAAGCA 	686
28	AUUUAAACUUAAAACCA	687
21	GAUAAAAAUCAAAGCAUAGCCC 	688
29	GAUGGCAUUCAGAGGAUAGCCC	689
21	CCUCAAUUGAACGAUUA AAAAUUCAAAAGCAUA 	690
30	CCUCACAUUCAUUGACAAGCAGUUGGCACUUA	691
21	AAGUUUUUCUAUGUG-CAGGCCA-GACA 	692
31	AAUCCAAUCUAUUGACAAGCAUGACA	693
21	UGAAGUC-AACCCGGCUAUCAGGCUUCAACCUCAAUUUGAAGCAUUA AAAAUUCAAAAGCAUAGCCCUGAAAGA	694

40		707
	AGCCAGAGAU—GAAAGGAAA		
21	AAGCAUAGCCCUGAAGAAAGAAAGACAGGACCAUGUCCUGAUGCAGACUUUG 		708
41	AAGGCGUGGGGAAAUUUGAGAGCAAUUUGCUCAGUUUGAAGACUCA—ACUUUG		709
21	AGCCUGAAAGAGAAAGACAGGACCA—UGUUCUGGAUGCAGACUUUGGCCCUUUACAAAUCAUUUUAAAGCAAAG .		710
42	AGCCUUAUAGAAUGGAAACACUUCUCAAUGCUCGACCCUGUCUGUAA—GGACUUUGAAGAUCUUUUAAAGCAAAG		711
21	ACAAGGCCAUGUCCUG 		712
44	AGAAAGACAAAUCCUG		713
21	UUACAAAUCUUUAAA—GCAAGUCUUUCUGAUGCAGGCCAGAGAAA—AGAGCUA .		714
46	UUUCAAAGAGAUUUAAAUGAAUUUGUUUUUGGU—UGGAGGAAGCAGAUAAACAUGCUA		715
21	AGCCUGAAAGAAAG 		716
47	AGCCAGAA—GAGCAAAG		717
21	UUCACCCUCAAAUUGAA		718

48 UUGAAGCUCAAUAAAA	719
21	UGGAGCAGACUUUGU . .	720
49	UGGAG-AGAUUUUGU	721
21	CCAUGUCCUGGaug . .	722
51	CCAUCUCCUUGaug	723
21	AAUGAACGAUAAAAUUCAAAGCAUAGCCUGAAAGAGAAAGCAAG 	724
53	AAUGAAAUGUUAAAAGGAUUCACACA AUGGC-UGGAGCUAAGGAAGAG	725
21	CCCAUGUCCUGGAGCAGACUUUGGCCU--UUACAAA 	726
55	CCCCUGACCUGGA--AAAGUUUCUUGCCUGGCCUUCACAGA	727
21	GAUGAAGUCAACCGGCUAUCAGGUCUU 	728
57	GAUGAAUUAAGCGGCGCAGCACCUAUU	729
21	GGCCUUUAC-AAAUCUUUUUAAAGCAAGUCUUUCUGA	730

59 GGUUUCUACGAAAGCAGGCUAGGAGGAGGUCUAAUACUGA	731
21	CCUGAAAGAGAAAG . . .	732
60	CUCUGAAAGAGAACG	733
22	GGUCCAGCAGUCAGAAACCAACUC 	734
50	GGCAAAGCAGCCUGA--CCUAGCUC	735
22	CACCAUUGCCUUAUCAGGAGACCAUGAGUGCC 	736
52	CAACAAUGCAGGAUUUGAAACAGAGGGUCCC	737
22	CGCUAUCAGGAGACCA . . .	738
58	CUCUACCAGGAGCCCA	739
23	AAUUAUCAGAAUUUGAAAGAAUUGAGGG 	740
24	AAUCACAUACAACCCUGAAAGAAUUGGAUGG	741
23	GAUAUCAACAGAAUUUGAAAGAAUUGA	742

31 AUCAGU-UUAGAAGAAAUGAAGAAC	755
23	AGUUCUCGCAAGACAAAGUG 	756
32	ACUUGCCUGCAUUGGAAACAAAGAG	757
23	AAAUAAGCCGGAAUAUCRAUCAGAUUUGAAGAAA 	758
33	AAAGCAGACGGAAA-AUCCCAAAGAACUUGAUGAAA	759
23	AAAGAAAGCCCCUCUGAAUUA-GCCGGAAAUU--CAAUCAGAAUUUGAAGAAAUUGAGGGACGCUUGGAAAGAGCUCUCCUCCAGCUGGUUGAGCAUUGUCAAAAAGCU// 	
34	AAAGAAAGCAACAGUUGGAGAAAUGCUUGAAAUUGCCGUAAGAUCCGAAAAGAAAUGAAUUCUJ-UGACAGAAUUGGCCUGCAUAGAAUUGGAAUUGACAAAAG---// //AGAGGAGAAAUGAAUAAACUCCGAAAUAU 	760
	//AGAUACGACAGUUGAAGGAAUAGCCUAGUAAU	761
23	CCACUGAAGAGAGAUUCGAA--GAAAGGCCUUCUGAA 	762
35	CUACUAAAAGAGAUUGAAGAAACAGAGGUCAC-CUGAA	763
23	ACAAAGUGGCCUAUACUUCUCAG-CACCACUG--UGAAAGAGAUUCGAAAGAAAGGCCUUCUGAAAUAAGCCG	764

42	777
23	ACGAUGGUGAUGACUGAAGACAU-GCCUUUGGAAUU	778
44	GAAUUAGCCGGAUAUCAAGAAUUUGAAGAAUUUGAGGAC--GCUGGAGAGCU	779
23	780
46	GCUAGAGAACAAAAGAAUUCUUGUCAGAAUUUCA	781
23	GAAAUUCAUCAAGAAUUUGAAGAAUUUGAGGCGC	782
47	GGAAUUCUCAAACA--AUUAAAUGAAAUCUGGAGGCC	783
23	GAAGAAUUGAGGCGUGGAGGAGCUUCUCCGAGCUGGUGAGCAUUGUCAAAAGCUAGAGGACAAUGAAUAACUCC	784
48	GGAGAAUUGAAG--CUCAAUAUAAAAGCCUUGGGC-AGCUUGAAAAGAAAGCUUGAAGACCUUGAAGAGCAGUUAUAUCAUCUGC	785
23	UGGAAAGAGAUUGGAGAAAAGCGC	786
49	UGGAGAGAAUUUUGUCUAAAAGGGC	787
23	UUCUCGCAAGACAA	788

51 UUCUCUGCUUGAUCAA	789
23	GAAAUUCAUUCAGAAUUGAAAGAAUUGAGGACGCU--GSAAGAAGCU .	790
53	GAAAUUUUA--AGGAUUCACACAAUUGGCUAGGAAGAAAGCU	791
23	UUUGAAGAAAUUAGGGAGCGUUGAAGAAGCUUCUCCAGCUUGAGCAUUGUCAAAGCU--AGAGGACAAAUGAAUAAAUCUCCGAA 	792
55	UUUGAAGAAAUCUAGAUUACUGCAACAGUUCUCCUUGGACCGGAAAAGUUUUGUCCUGGUACAGAAAGC---UGAAACAACUGCCAA	793
23	UUCUCUGCAAAGAC 	794
57	UUCUCUGCAGGAAC	795
23	CUCCUCCAGCUGUUGAGCAUUGUCAAAGCUAGAGGACAAUAGAAUAAACUCCGAAAUUCA .	796
59	CUGCACUCCUGCUG-GCAGAG---AAAAUAGAUGAGACCUCUUGAAAGACUCCAGGAAUUCA	797
23	GAAGAAAGGC-CCUCUGAAA 	798
60	GGAGAAUUGCGCCUCUGAAA	799
24	AUUCAGA-AAUUCUAAAAGCAGUAAACAGUG	800

25	801
	AUCAGACAAUUC----AGCCAGUCUAAAACAGUG	
24	UGAAGAAAUGGAGGCGAAGUUGAUG	802
	
26	UGCACGAAUGGAGACACAAAGCUGAAG	803
24	UAAAAAGCAGCU-GAAAC	804
	..	
27	UAAAAAGGAAACUUGAAAC	805
24	ACAUCAAACCUCUGAAGAAAUGGAGGCGUAGUUUU-UCUGAAG	806
	
28	ACUUAAAACACUGAAAACAUCCUGGCGGA-GCUGAGGAAAUCUCUGAGG	807
24	ACAAACCCUGAAGAAAUGGAGGCGUAGUUUUUCUGAAGGAGAA	808
	
29	ACAGACCCU-AACAGAUGGCGGAGUCAUG--GAUGAGCUAAUCAAGAGAA	809
24	AAAAGCAGCUGAAACAGUGCA	810
	
30	AAAAGUUCUUGAACACAGCA	811
24	UGGCGAAAGUUGAUGUU	812

31 UGUCACAGAUUGAUUU	813
24	UGAAGGAGSAAUGCCUUGGGAUUCAGAAAUUCUAAAAAAGCAGCUGAAACAGU UGAAGUACUCUUGCCUGCAUU---GGAAAACAAGUGGAAACAGGAAGUAGUACAGU	814 815
24	ACCCUGNAGAAUGGAUGGCCUGAAGUUGAUUUUCUGRAGGAGGAUUGG 	816
33	AACUUGUAAAACUCUGAGUGAAGU-CAAGU----CUGAAGUGGAAAUGG	817
24	GAAUGGCCUGCCUUGGGAUUCAGAAAUCUAAAAA----AGCAGCUGAAAACAGUGC 	818
34	GAAUGGCCUGCAGCUCACAGAUUGGAAUUGACAAAAGAGAUAGCAGCAGUUUGAAGGAUUGC	819
24	AGAAAUGGAUGGCCUGAAGUUUGUUUUUCU--GAAGAGGAUUGGCCU 	820
35	AGAAACAGAAGG-UGCACUAGAGUUCACAGAGGUGAGAGAGGCCU	821
24	AAUCACAUACAAC AAACACAUUGGAAAC	822 823
24	ACAUACACACCUCUAGAAAUGGAUGGCCUGAAGUUUGAU-----GUUUUCUGAAGGAGGAA	824

46		837
	AUGGUUGGAGGAAGCAGAU		
24	UUUCUGAAGGAGGAUUGGCC--UGCCCUUGGGGAUUCAGAAUUCUAAAA--AAGCAGUCGAAACAGUGC		838
		
47	UUACUGGUGAAGAGUUGCCCUUGCCCGCAGGAAUUCUCAAUAUAAUAAACUGGAGGACCCGUGC		839
24	GAAAUUCUAAAAAGCAGCUGAACA		840
		
48	GAAGACCUUGAAGAGCAGUUAUAUCA		841
24	CUGAAGAAUUGAUGGCUGAAGUUAUUUUUCUGAAGG		842
		
49	CUAAACAACCGGAUG--UGGAAGAGAU-UUUGUCUAAAGG		843
24	UGCCCUUGGGGAU-UCA--GAAAUUCUAAAAAAGCAG		844
		
51	UGACCUUGAGGAUUAACAAGGAGAUCAUCAAGCAG		845
24	AAUCACAUACAAACCUGAAGAAUUGGAUGGCUGAAGUUGA-UUUUUUCUGAAGGA		846
		
53	AAGUACA--AGAACAACCUUCAGAACCGGA--GGCAACAGUUGAAUAAAUGUUAAAAGGA		847
24	AGGAUUGCCUUGCCUUGGGGAUUCAGAAAUUCUAAAAAAGCAGCUGAACAAGUG		848

42	<p> ACACUGCCGGGAGAAACGAUGAUGGAGACUGAAG</p>	885
25	<p>UCUAAAACAGUCUAUGAA--GGUGGGCAGAGAUAAGAAAGCAGA--GCCAGAUUUCUUCGAGACUUGAGA </p>	886
44	<p>UAUAAAGAUUUUAUCAGUGGCUAACAGAGUGAACAGUUCUCAGAAAAGACAAAAUUCCU--GAGAAUUUGGA</p>	887
25	<p>GACAGAACU-CAAGA-ACUAAA </p>	888
46	<p>GUCAAAUUUCAAAAGAGAUUAAA</p>	889
25	<p>CAGCCAGUCU-AAAACAGUCUAUGAGGUGG </p>	890
47	<p>CAGGAAUUCUCAAACAUAU- AAAUGAAACUGG</p>	891
25	<p>CUUGAGACAGAAUCUCAAAGACUUAACACUCAGUGGUAUCACAU </p>	892
48	<p>CUUGAAAAAAAGCUUGAAGACCUUGAAGAGAGACUUAUAUUCUUG</p>	893
25	<p>CAGCCAGUCUAAAA </p>	894
49	<p>CAGUUCAGCUAAACA</p>	895
25	<p>AGUUUGCUUCGAGACUUGAGACAGAACUCAAAGA</p>	896

51	. .	897
	AGAUUUCACACGGGCUUG-GACAGAACUUACCGA	
25	UCAAGAACUUAACACUCAGUGGAUCA	898
	
53	UGAAGAA-UUCAGAACUAGUGGAUGA	899
25	AGAGUUUCUUCGAGACUUGAGACAGAA-CUCAAGAACU	900
	
55	AAAGUUUCUUCGCGGUU---ACAGAAGCUGAAACAACU	901
25	AAGUAAAAGAAUGAAGCAG	902
	
57	AAGAUGAUGAAUUAAAGCCG	903
25	AGAGCC-AGAGUUUCUUCGAGACUUGAGACAGAACUCUAAAAGACUU-AACACUCAGUGGGAUCACAUUGCCACA	904
	
59	AGAGCCAGAAUGUCACUCGCGCUUCAGAAAGCAGGCGUCAGAGGUAUAUCUGAGUGGAAAUUGAACCCUGCA	905
26	AGCUGAAGAAGAGUUCUUGAGAGAGAUUUUGAAUAUAAAACUCCAGA-UGAAUUACAGAAAGCAGUUGAAGAGAUAGAAG	906
	
27	AGCUAAAAGAGAGCCCAACAAAAGAGC-GAAAGUGAAGCUCUUCAGAGU--CUGUAAAUGUGUUAUAGCUCAAG	907
26	UGAGAGAUUUUGAAUAUAAAACUCCAGAUCAAUUACAGAAAGCAGUUGAAGAGAU	908

35 GAGCCUUGAAAACAGUUUGGCAAGAAGAGAGACGUUGGUGGAAGAUAAAUCUCAG	921
26	AAGGAGUUUGGAGAAAACUGUAAAGCCUC--CAGAAAG---AUCUUCAGA--GAUGCACGAAUGGAUGACACA-AGCUGAAGAA 	922
36	AUGAAAACUUUGACCAGAAUGGGACCACAUACAATAAGUGAUAUCAGGCGACACACAUUUGGAUAAUCAGAGAAAAAGAA	923
26	AAUCCGAAUGGAUCACAGCUGAA 	924
37	AAAGCAGAACUGAUAUACGCCCAA	925
26	UCAGAGUCCAGAAUGGAUGACACAAGCUGAAGAAGAUUCUGAGAGAGAUUUGAAUUAATAACUCCAGAUAAUUCACAGAAAG 	926
38	UCAGAUUACAAAAAUUCUUGAACACCUGGAGGCGUAAAUCAGCAGGGGG---UGAAUCUGAAAAGA--GGAAGACUUCAUAAAG	927
26	GAGAGAUUUUGAAUUAATAACUCCAGAUAAUUCACAGAA 	928
39	GCGAGGAAAUAAGAUAATAACAGCAGCUG--UUACAGACA	929
26	GAGUUUGGAGAAAACUGUAGCCUCCAGAAAAGUCU-AUCAGAGUCCAGAAUGGAUGACACACAGCUGAAGA 	930
40	GAGGUCAAAAGAAAAAGCCUCUAGAAAUUUCUUCACUGUGU--AUCAGUACAAGCAGCAGCUGAUGA	931
26	GAUUACAGAAAGCAGUUUGAAGAGAA	932

28	<p> </p> <p>ACAAGUGGC-UAAAUGAAGUAGAAUUAAAACUUAAAACCAC</p>	957
27	<p>UAAAAAGGAACUUGAAAC</p> <p> </p>	958
29	<p>UCAUUGAGGAACUUGAGAC</p>	959
27	<p>AGCUCAAGCUCACCUCUGAGCACA</p> <p> </p>	960
30	<p>AGCUCAAAUUGCCUCAGGAAGCCCA</p>	961
27	<p>AAAAGAAGCGAAAGUGAAACUCCUUAUCGAGUCUGUAAAUAAGUGUCAUAGCUCAAGCUCACCUCUGUAGCACA</p> <p> </p>	962
31	<p>AAAUGAA--GAAACAUAUUCAGGGGAAGAGGCGCCCAAGAGAGUCCUCUCUCA-GAUUGA--UGUUGCACA</p>	963
27	<p>AGUGGCUCUGCACUAGGCUGAAUGGGAAUUGCAAGACUUUGGAA</p> <p> </p>	964
32	<p>AGUGAAGAUAGCACAUCUUGCCUGCAUUGGAAACA-AAAGAGUGUGGAA</p>	965
27	<p>UGUAAAUAUGUGUCAUAG-CUCAAGCUCACCUCUGUA--GCACAAGAGGCCUUAAAA--AAGGAACUUGA</p> <p> </p>	966
33	<p>UGGAAAUGGUGAUAAAACACUGGACGUCAGAUUGUACAGAAAAGCAGACGGAAAAUCCCAAGAACUUGA</p>	967
27	<p>AAGAAGCGAAAG---UGAAAACUCCUUCUGAGU</p>	968

40	981
	AAAAAGGCUCUAGAAAUUUCUCAUCA	
27	UGAAUGGAAAUUGCA	982
	...	
41	UGAUCGGAAAUUGCA	983
27	GAAACUCCUUCUGAGUCUGUAAAUAUGUGUCAUAGCUCUAGCCUCCUAGCACAAGAGCCUUAAAAAGGAAC	984
	
42	GAAUUUCUUA-UGUGCCUUCUACUUUUUGA---CUGAAAUCACUCAUGUCUCAAGCCCUUAUAGAAGUGGAAC	985
27	UCUGUAAUAGUGUCAUAGCUCUAGCCUCCAC	986
	
44	UAUUAAUUCAGUGGC-UAACAGAAAGCUGAAC	987
27	AGCUAAAAGAGAGGCCCAACAAAAGAAAGCGAAAAGUGAAAACUC	988
	
46	ACCUGAAAAGAGCAGCAACUAAAAGAAAAGCUUUGAGCAAAGUC	989
27	AGAAGCGAAAGUGAACU	990
	...	
47	AGAAGACCAAGAUAACU	991
27	AGAGCUAAAAGAGAGGCCCAACAAAA---GAAGCGAAAGUGAAAUCUCCUUCAGUCUGAGUCUGUAAPUA	992

59 CUGCACUCCGCCUGACUGGCAGA	1005
27	AAGGAAAAGUAAAAUCUCCUUAACUGA 	1006
60	AAGAGAACGUGAGCCACGUCAAUGA	1007
28	AUUGCUAUACUUGGAGAAAAGCA-AAACAAGUGGCCUAAAGAAGUAUUUAAAAUCUAAAAACCACJGAAAACAUU 	1008
29	AUUGGCAUUAUUGGCACAGACCUAACAGAAUGCCGGAGUCAUGGAUGAGCUAAUCAAAUGAGGAAACUUGAGACAUU	1009
28	GUUGGC AUGAUUUGUCAUACUUGGAGAAAAGCAAA-CAAUGGCCUAA 	1010
30	GUUGGCACCUUAUUUUG-CAGACAAGGUGGAGCCAGCCUCAAUUGCCUCA	1011
28	AAAUGAAGUAGAAU . .	1012
31	AAAUGAAGAAAACAU	1013
28	AGAAAAGCAACAAGUGGCCUAAAUGAAGUAAGAAUUUAAAACUAAAACACUGAAAAACA 	1014
32	AGAAAAGUAAG-AUGAUUUUUAUGAAGAU-GAAGAUGCACUUGCCUGCAUUGGAAAAACA	1015
28	ACAAGUGGCCUAAAUGAAGUAGAAUUUAAAACUAAAA	1016

47 AAGCCAGAAAG-CAAGAUAAACUUGAAAUAAGCUCAA	1041
28	AAUGAAGUAGAAUUAACUAAACACUGAAAACAUCCUGGCGAGCU-GAGGAAUCUCUGAGGUGUAGA 	1042
48	AAACAAGGAAAUUGAAGCUCAAU- - - -AAAAGA--CCUUGGCGAGUUGAAAAGAAGCUUGAAGACCUUGA	1043
28	AAAUGAAGUAGAAUUAACUAAA 	1044
49	AACUGAAUAAGCAGUUCAGCUAAA	1045
28	CUUGGAGAAAACAAACA-AGUGGCUAAAUGAAGUAGAAUUUAACU-UAAAACCACUGAAAACAUCCUGGCGAGCU-GAGGAAUCUCUGAGGUGCU 	1046
51	CUUGACAGAAUUCGACUGGCUUCUCUGCUUGA--UCAAGUUAUAAAUCACAGAGGUGAUGGUGAGCUUGAGGAUAUCAAGGAGAUGAU	1047
28	AGUAGAAUUUAACUAAAACCACUGAAAACAUUC-CUGGCGAGGUGAGGAAAUUCUCUGAG 	1048
53	AGUUGAAUG-AAAUGUUAAGGAUUCAACACAAUGGCUUG--AAGCUAAGGAGGAGGAG	1049
28	AAACUUAAA-ACCACUGAAAACAUUCUGGCGGAGGAGGAAAUCUCU 	1050
55	AAACUCAUAGAUUACUGAACAGUUCGAGUUCGAGGAAAAGUUCU	1051
28	GCUAAAUGAAGUAGAUUUA	1052

57	<p> GCUGAAAGAGAUGAAUUA</p>	1053
28	<p>GUAGAAUUUAACUUAACACUGA </p>	1054
59	<p>GAAAAUUUGAACUCUGCCUGA</p>	1055
29	<p>CUJGAAUUUUGAUGGCAUUCAGAGAUACCCAAUUCAGAUUCGUAUUGGCAAGACCCUACA </p>	1056
30	<p>CUJGAACACAGCAUCACUCUCCCCAGGACACUGAAAAUCCUUACAUUAAUCCAGGACUCCCTACA</p>	1057
29	<p>AGUCAJG-CAUGGCU---AAUCAUAGGAA </p>	1058
31	<p>AGUCAJGACAUCAUUAAGAAUAGAA</p>	1059
29	<p>ACAUUCAGAGGAUAACCAAAUCAGAUUCGUAUUGGCAAGAC </p>	1060
32	<p>AAAUJACAAGAUUCUCCUAAGUUUCGAUUUUC-CAGAAAC</p>	1061
29	<p>AAAUJUGAUGGCAUUCAGAG </p>	1062
33	<p>AGACCJUGAUAAGAGUACAG</p>	1063
29	<p>CAGAUJCGCAUUGGCAAGACCUCACAGUUGGGAGU</p>	1064

34	1065
	CAGAUUGGA--AUUGCAAAGAGAUACAGACAGUUGAGGAU	
29	AACAGUUGGGAGUCAUGGAUGAGCUAAUCAUUGAGGAACUUGAGACAUUAA	1066
	
35	AACAGAAAGUGCA--CCUG--AAGAG--UAUCACAGAGGUGAGAGGCCUUGAA	1067
29	CACUUGAAA--UUUGAGCACAUCAGAGGAUAACCCAAUCAGAUUGCAUUGGCACAGACCUCACAGAUG	1068
	
36	CACAUGGAACUUUUGACCAG--AUGUGGACCACACAAAGUGGAU--CAUUCAGGCGACACACUUUUGGAUG	1069
29	GCAUUUGGCACAGACCCUAA--CAGAUUGGGGAGUCAUGGAGAGC	1070
	
37	GGAAUUUAGUAGGCCCAAAUCUCAGAGGCUACACCAUCAGAUUGC	1071
29	AGGACUUGAGACAUUUUAUUC	1072
	
38	AGGAAUUGGAGCAGUUUAUCUC	1073
29	GAGUCAUGGAUGAGCUAAUCAUUGAGGAACUUGAGACA	1074
	
39	GAUCACAGAUAGAGAAAAGCGAGAGGAAAUAAGAUA	1075
29	UCACUUGAAA--UUUGAUGGAGAUUCAGA	1076

40	UCUCCUGAAAUGCUGGAU--GACAUUGAAA	1077
29		AGCCAAAUCAGAUUC	1078
41	. . .	AGCCAAUCAGAUCC	1079
29		CACAGACCCUAACAGAUG	1080
42	. . .	CACAGCCCUAUUAGAAG	1081
29		AUUCAGAGGAUAACCCAA---AUCAGAUUGCAUUGGCACAGAC--CCUAACAGAUGG	1082
44	AAUCAGUGGCUAACAGAAAGCUGAACAGUUUCUCAGAAAAGACACAAAUUCUCCUGAGAAUUGG	1083
29		GAUGAGCUAAUCAUAGAGGAACUUGAGACAUUUA	1084
46	GAGCACAACURAAAGAAAGCCUUGAGCAGUCAA	1085
29		ACUUGAAAUAUUGAU---GC-GACA---UUCAGAGGAUAA	1086
47	. . .	ACUUGAAAUAUAGCUCAGCAGACAAAUCUCCAGUGGAUAA	1087
29		UCACUUGAAAAUUU	1088

48 UCAGUUAGAAUUU	1089
29	AGCUAAUCAGAGGAACUUGA-GCAUUU 	1090
49	AGCUAAACAACC-GGAUGUGGAAGAUUU	1091
29	AACUUGAGA--CAU-UUAAUUUCUGUGGAGGAACUAC 	1092
51	AACUAGAAAUGCACUUCUUCUUGAUGUGGAGGUACCUGC	1093
29	UUGAGACAUUAAUUCUCUGUGGAGGAACUACAUGAAGA 	1094
53	UUGAAAAGAAUUCAGAAUCAGUGGGAUGAAAGUACAGAACA	1095
29	CUUGAAA-UUUGAUGC--GACAUUCAGAGGAUACCCAAUCAGAUUCGCAUUGGCCACAGACCC-UAACAGAUGGC . .	1096
55	CUGAAAAGUUUCUUGCCUGGUACAGAAGCUGAAGAAACAACUGCCAAUUCUACAGGUAUCGGUAAGGAAAGGC	1097
29	AUUUGAUGCGCAUUC 	1098
57	AUUGGAGCGCACUUUC	1099
29	GAFAUUUGAUGCGCAUUCAGAGGAUACCC---AAAUCAGAUUCGCAUUGGCCACAGACCCUACAGAUUGCCGGGAGUC-AUGFAUGAGCU	1100

59 GAAAAUUGAACCCUGCACUCGCCUGACUGGCAGAGAAAAUAGAUGAGACCCUUG--AAAGACUCCAGGAAUUCUCAAAGAGGCCACGSAUGAGCU	1101
30	UAAAGGAGCAAAAAGUUGCUUGAACAGAGCAUCCAGUCU 	1102
31	UAAUCAGGGGAAGGAGGU--GCCCAAAAGAGUCUCUCU	1103
30	ACAAGCAGUUGCAGCUUUAUUGCAGACAAGGUG 	1104
32	AGAUGCACUUGCCUGC---AUUGGAAACAAGAG	1105
30	AGGAGACUGAAAAUCCUUAACA-CUUUAUCCAGGAGUCCC-----UCACAUCAUUGACAAGCAUUGGCAGC 	1106
33	AGCAGACGGAAAAUCCCAAAAGAACUUUGAUGAAAGAAAGUAGAGACAGCUUUGAAAUUGCAUUAUUAUGAGCUGGCAGC	1107
30	UUGACA-AGCAGUUGGCAGCUU--AUUUGCA--GACAAGGUGGAC-GCAGCUCAA----AUGCCU 	1108
34	UUGACAGAAUGGCUGGCAGCUACAGAUUGGAAUUGACAAAGAGAUCAAGAGAUCAAGUUGAAGAAUGCCU	1109
30	GUAAGGAGCAAAAAGUUGCUUGAACAGCAUCCAGUCUCCAGGAG--ACUGAAAA 	1110
35	GCAAGAAG-AGACGUUGGGAAGAAUAA-ACUCAGUCUUCUGAAUAGUAACUGGAUA	1111
30	ACAAGCAGUUGGCAGCUUUAUUGCAGACAAGGUGGACG-CAGCUCAAA-UGCCUCA	1112

		
51	GCUUGACAGAAUUACCGACUGGC		1135
30	GGAGGCAAAAGUUUCUUGAA		1136
53	GGAGGCAACAGUUGAAUGAA		1137
30	GCAAAAGUUCUUG		1138
55	GGAAAAGUUUCUUG		1139
30	AAAAAUCCUACA		1140
57	AAAAUCCUGAGA		1141
30	UGAACAGACUCCAGUCGCC		1142
59	UGAUCAAAGGAUCCUGGACGCC		1143
30	UGACAAGCAGUUGGCAGCUAU		1144
60	UGAACACCAGAUUGGAAGCUUCU		1145
31	ACAAGUCA-UGAGAUCAUUUAGAGAAAUGAAAGAAC		1146

36 UCCAUUC--CUUUG--AAGGAAUUGGAGCAGUUUAACUCAGAUUAUCACAAAAU	1159
31	AUGAGAUCAGUUUGAAGAAUGAGAAAACAUAAUCAG 	1160
39	AUGAGAAAGCGAGAGGAAUAAAGAAUAACAGCAG	1161
31	UCAUGAUCAGUUUGAAGAAU--GAAGAACAUAUC 	1162
40	UCCUGAAU--GCUUGAUGACAUUGAAAAAAAUAGC	1163
31	AUUUGACAAGUCAUGAGAUUCAGUUUAGAGA 	1164
41	AAUUGAGACAAAUUUCUCAGUUUCGAGA	1165
31	GAAGAAUAGA . .	1166
42	GAAGAAACGA	1167
31	AAAGAAUGAAGAAACAUAUCAGGGG--AAGGAGGUGCCCA 	1168
44	AUCAUAAAGAAUUAUUAUCAGUGCUAACACAGAGCUGAACA	1169
31	UAGAAGAAUAGAAGAA	1170

46	... UAGAGAACAAAAGAA	1171
31	AAGUCAUGAGAUCAUUAGAGAAAUGAAGAACAU---AAUCAGGGGAGGAGGC 	1172
47	AAGUGUCCCAUAAGCCAGAGAGCAAGAUAAACUUGAAAAUAAGCUCAAGCAGAC	1173
31	AAAUCCAUCUGAUUUGACAAGUCAUGAGAUCAUGAUUUAGAGAAA---UGAAGA 	1174
48	AAUUGAAGUCUAAAUAAGACCUGGG--CAGCUUGAAAAAAAAGCUUGAAGA	1175
31	GGGAAG-GAGGUCGCCAAGAG 	1176
49	GUGAAGACAUUUUCUAAAGG	1177
31	UCUGAUUUGACAAGUCAUGAGAUCA 	1178
51	UCUGCUUGAUCAGUUUAAAAUCA	1179
31	GGAAGGAGGUCGCCAAGAGU 	1180
53	GGAAGGAGGUCUUAACAGU	1181
31	UAGAGAAAUGAAGAACAA	1182

55 UAAAAGAGCUGAUGAACA	1183
31	AUUGACAAGUCAUGAGAUAGUUAGAAGAA 	1184
57	AUUGAGGGGACUUCCAGCAGUUCAGAAGCA	1185
31	UAAUCAGGGGAGGAGGCCGCC 	1186
59	UGAUCAGGGAUCCUGGCAGCCC	1187
31	AUCAGUUUAGAAGAAUAGAAGA 	1188
60	AGCACUCUGGAAGACCUGAACA	1189
32	UGAAGUAGAUGCACUUGCCUGCAUUGGAACAAGAGUGGAAACAGGAGUACAGUCACAGC 	1190
33	UGAAGUAGAUGCUGAAGUG---GAAUUGGUGAUAAAGACUGG---AGCUCAGAUUGUACAGAAAAGC	1191
32	GUAGAUAUUUAGAUGAAGUAGAUAGCUCUUGCCUGCAU---UGGAACAAGAGUGUGGAA 	1192
34	GUAGAUG---CGAAAGGAUAUGAU---CUUGACAGAAUGCCUGGCAGCUACAGAUUGGAA	1193
32	AAACAAGAGUGUGGAACAGGAAGU	1194

49	. AAAAACCAGCCACU	1219
32	UUGAGCAGCGUCUACAAGAAAGUAAGUUAUUAAGAUAAGU-GAAGAU .	1220
51	UUGAUCAGUUAAAAUACACAGAGGGUGAUGGUGGGUGACCUUGAGGAU	1221
32	UGGAAACAAAG--AGU-GUGGAACAGGAAGUAUACAGUC-ACAGCUAA .	1222
53	UGGAAGCUAAGGAGAGAGCAGGUCUUAAGGACAGGCCAGAGCCAA	1223
32	CAGAAACCA--GCCAAUUUGAGCAGGU-CUACAGAAGUAAGUAUUUAUGAUGA .	1224
55	CUGAAACAACUGCCAAUGUCCUACAGGAUGUCCCGUAAGGAA-AGGCCUUAAGAAG AGCCAAUUUGAGCAGCG 	1225
32	AGCCAAUUUGAGCAGCG	1226
57	AGCCAGUUCUGACCAGUG	1227
32	GAUGAAGUAAGAUGCACUUGCCUGCAUUGGAAACAAGA .	1228
59	GAAAAUUGAACUUGCUCUCCUGACUGGCCAGAGAAAA	1229
32	AGAUGCACUUGCCUGCAUUGGAAACAAGAGUGGAAC	1230

41 UCAGAUCCAGCUCAGCAAGCGCGCGGGGAAAU	1243
33	UGAAGUGGAAAUGGUGAUAAAAGACUGGA 	1244
42	UGAAGAAAACGAUGAUGGUGAUGACUGAA	1245
33	AAAGA-ACUUGAUGAAGAGUAACAG 	1246
44	AAAGAUUUAAUCAGUGGCCUAACAG	1247
33	AACUUGUAAAAGUCUGAGUGAAGUGAAG 	1248
46	AACUAAAAGAAAAGCUUGAGC-AAAGUCAAG	1249
33	GGAAAUCCCAAAGAACUUGAUGAAA---GAGUAACAGCU-UUGAAAUUGC 	1250
47	GGAAUUCUCAACAUAUAAAUGAAACUGAGGAGCCCGUGCUUGUAAGUGC	1251
33	AAAUCCCAAAGAACUUGAUGA 	1252
48	AAAAGCUUGAAGACCUUGAAGA	1253
33	CUGAAGUGGAAAUGGUGAUAAAAGACUGGACGUCAGA--UUGUACA--GAAAAAGCAGAC	1254

49	<p> </p> <p>CGG AUGGAA---GAGUUUGUCUAAAAGGCAGCAUUUGUACAAGGAAAAACCAGCC</p>	1255
33	<p> </p> <p>CAGACGGAAAUCCCAAGAACUUGAUGAAGAG-UAACAGCUUG--AAAUUGCA</p>	1256
51	<p> </p> <p>CAAAUAGAAAUCCCAUCCUUGAUGUGGAGGUACCGUCUCUGGCAGAUUCA</p>	1257
33	<p> </p> <p>AGAAUUGAUGAAGAGU---AACAGCUUGAAU--UGCAUUUAUGAGCUGGGAGCAAAG</p>	1258
53	<p> </p> <p>AGAACGGAGCAACAGUUGAAUUGAAUUGAAAGAUUACAACAUAUG-GCUGGAAGCUAAG</p>	1259
33	<p> </p> <p>AAAAGACUUGAAGAAGUAACA</p>	1260
55	<p> </p> <p>AAAAGACU-GAUGAAACAUGGCA</p>	1261
33	<p> </p> <p>GAAUGAAGUCUGA--AGUGAA</p>	1262
57	<p> </p> <p>GAAAGACUUGAAGAAGUAACA</p>	1263
33	<p> </p> <p>AGUCUGAGUGAAGUAGUGAAGUGGAAUUGGUAUAAAG-ACUGGAGCUCAGAUUGU-ACAGAAAAAGC---AGAGC---GAAAAUCCCAAGACUUGAUGA</p>	1264
59	<p> </p> <p>AGGUCAG-CAGGUCAAUCUGAGUGGAAAAUUGAACCUAGCU---CCGUGACUGGAGAAAAUAGAUAGAGACCCUUGAAAGACUCCAGGAAACUUCAGAA</p>	1265
33	<p> </p> <p>CAAGAACUUGAU-GAAAGAGUAACAGCUUGAAAUU</p>	1266

60	1303	. ..	AGAAAUUGGCCUCUGAA
35	1304	GCAAGAAGGAGCGU	
36	1305	.	GCAAAAAGAAGCGU
35	1306	UGGCAAGAAGGACGUUGGGAAGA	
37	1307	.. .	UGACCAAGCAGCAAAC-UUGAUGGCAAA
35	1308	GCUACUCAAAAAGAGAUUGAGAAACAGAAAGG-UGCACCUGA--AGAGUAUCACAGAGGUAGGAGGCCUUGAAAACAGUUUUG	
38	1309	GAUAUCAAAAUAUUGCUUGAACCAACUGGAGGCUGAAAUUCAGAGGGGUGAAUCUGAAAGAGGAAGACUUCAUAAAAGAUUG	
35	1310	GCUACUCAAAAAGAGAUUGAGAAACAGAAAGGUGCACCUGA---AGAGUAUCACAGAGGUAGGAGAG	
39	1311	GGUACUGUAAAAGA-AUUGUUGCAAAAGAGGACACAAUCUUCACAAAGACAAUUCACAGAUACAGACAAG	
35	1312	CUCAAA-AAGAGAUUGAGAAACAGAAAGGUGCACCUGAAGAGUAUCACAGAGGUAGGAGGCC	
40	1313	CUCAAGAAGAAAAGGCUUAGAAAUUUCUACAGUGGUUCA-----GUACAAGAGGC	
35	1314	GAGUAUCACAGAGGUAGGA-GAGGCCUUGAAAACAGUUU-UGGCAAGAAGGAGACGUUGGUGAAGAU	

42 UUAAGCAAGAGGAGUCUCUGAA	1412
38	GAAUUGGAGCAGUUUACUCACAGAUACAAAAUUCCU GAAACUGAACAGUUU--CUCAGAAAAGACAAAAUCCU	1413 1414
38	AAAAUUCUUGAA--CCACUGGAGGCGAAAAUUCAGCAG 	1415
46	AACAUUGCUAGUUCACCACUUGAACCCUGGAAAAAGAGCAG	1416
38	AAAAAUUCUUGAACACCACUGGAGG 	1417
47	AACAAUUAAAUGAA--ACUGGAGG	1418
38	UUGAAGGAUUUG--GAGCAGUUUAA . . .	1419
48	UUGAAGACCUUGAAGAGCAGUUAAA	1420
38	GAAUCUGAAAAGGA . . .	1421
49	GAAACUGAAAUGCA	1422
38	AAAUUCAGCAGGGGGUGA	1423

51	. AAAAUCA-CAGAGGGUGA	1424
38	UUGAAGGAUU--GGAGCAGUUUACUCAGAUACAAAAUUUCUUGAACCAACUGGAGGC 	1425
53	UUGAAGAAUUCAGAAUCAGUGGGAU--GAAGUACAAGAACACCUUCAGA-ACCGGAGGC	1426
38	AUUGGAGCAGUUUACUCAGAUACAAAAUUUCUUGAACCAACUG--GAGGCUGAAA 	1427
55	ACUGCAACAGUUCGCCUGGACCUGGAAAAGUUUCUUGCCUGGCUUACAGAAAGCUGAAA	1428
38	GAUUUCAGCAGGGGUGAAUCUGAAAAGAGGAAGACUUCA 	1429
57	GAACUUCUGGUGUGGCUACAGCUGAAAAGAUUGAUGAAUAAA	1430
38	AGGGGGUGAAU-CUGAAGAGGAGACUUCAA 	1431
59	AGGAGUCAAUACUGAGUG--GGAAAAUUGAA	1432
38	UCUGAAAAGAGGAAG 	1433
60	UCUGAAAAGAGGACG	1434
39	GAGAGGAAUAAAAGUAAA	1435

60	. . .	1460
	UGAAAGAGACGUGAG	
40	AUCUCCUGAAUCCUUGGAGUACAUGAAAAAUAUAGC	1461
	
41	AGCUCAGCAGCGCUGCGGGAAAUUGAGAGCAAAUUGC	1462
40	AAAAAAGGCUCUAGAAAUUUCUAU	1463
	
42	AGACAUGCCUUUGGAAAUUUCUUAU	1464
40	AGGCUUAGAAAUUUCUACAGUGG-UAUCAGUA	1465
	
44	AUGAUUAAAAGAUUUUAAUACAGUGGCUAACAGAA	1466
40	AUGAUCUCCUGAAAUGCUUGGAGUACAUGAAAAAUAUAGCCAG---CCUACCUGAGCCCGAGAUCAAAGGAAAAUAAA	1467
	. .	
46	AUGAAUUUUUUUUGGUUGGAGAA---GCAGAUACAUUUCUAGUUAUCCACUUGAAACCUUGSAAAAAGCAGCAACUAAA	1468
40	AAAGAGAAAAGGCUCUAGAA-AUUUCUCAUCAGUGG	1469
	. .	
47	AAACUUGAAAAUAAGCUCAGCAGCAAAAUCUCCAGUGG	1470
40	AAUUGCUUGGAGUACAUGAAAAAUAUUA	1471

48 AAAAGCUUGAA-GACCUUGAAGAGCAGUUA	1472
40	UUGAAAAAAUUAGCCAGCCUACCUGAGCCACAGAU 	1473
49	UUGUACAAGGAAAACCCAGCCA--CUACGCC-ACUGAAG	1474
40	UGGAUGACAUUGA 	1475
51	UGGGUGACCUUGA	1476
40	AAUUCUCAUCAGUGUAUCA-GUACAAGGAGGCGUGAUAUCUCCUGAAAUGCUGAUGACAUAUGAAAA 	1477
53	AAUUCAGAAUCAGUGGAUGAAGUACAAGAA-CACCUUCAGAACCCGGGACAAACAGUUGAAUGAAAAUUAUAAAA	1478
40	UUGAGGUCUCAAAGA-AGAAAAAAGGCUCUAGAAA 	1479
55	UAGAAACUCCAGGGAGUAAAAGAGCCUGAUGAAA	1480
40	AGAAAAUUUCUACAGUGGUUAUC 	1481
57	AGCCAGUUCUACCAAGUGAAGC	1482
40	AAGAAAAAAGGCUCUAGAAAUUUCUCAUCAGUGSUUACAGACAGAGGCGCUGAUGAUCUCCUGAAAUGCUGAUGACAUAUGAAAAAUAUAGCCAGC--//	

51 UGGCAGAUUUAACCGGGCU-UGGACAGAAUUACCGACUGG-----CUUUCUCUGCUUGAU	1542
43	CAGCUUGAUUUCCAAUGGGAAAAAGUUACAAAAUUAACAAGGA	1543
53	CACCUUCAGAACCGGAGGCAACAGUUGAUGAAAAUUAAGGA	1544
43	UGCAACGCCUCUGGAAAGGGU	1545
55	UGCUACCCGUAAGGAAAGGCU	1546
43	GGUGAAGCUACAG	1547
57	GGUGUGCUACAG	1548
43	AAUGGAAAAAGUUAAAC	1549
59	AGUGGAAAAAUUGAAC	1550
43	CUGUGAAAAGGGUGAAG-CUACA-GGAAGCU	1551
60	CUCUGAGACCUCUAACACCAGAUUGGAAGCU	1552
44	UUAUUCAGUGGCUACAGAAAG--CUG--AAACAGUUUCAGAAAGACAAA	1553

45	UGAAUCUGCGG-UGGCAGGAGGUCUGCAAAACAGCUG-UCAGACAGAAAAA 	1554
44	CAGUGCUAACAGAGCUGA 	1555
54	CAGUGCAGACAAAUGUAGA	1556
44	AGAAAGACAAAAUUCUGAGA 	1557
56	AAACAGCCAAAAAUCCUGAGA	1558
45	GCAACUGGGAGAAUAUUCAGCAA 	1559
46	GCAACUA--AAAGAAAAGCUUGACAA	1560
45	CAGCGCAAAACUGUUCAGAACAUUGAAUGCAACUGGGAA 	1561
47	CUGCGCAGGGAAUUCUCAAAACAUAUAAAUGAAAACUGGAGGA	1562
45	UUGGAAAGCCUGAA . .	1563
48	UUGGGCAGCUUGAA	1564
45	AGAUGCAGUAUUC-UACA-GGAAAA	1565

49	. AAAGGCAGCAUUUGUACAGGAAAAA	1566
45	CAGCAUCCUCAAAA-ACAGAUGCCA 	1567
51	CUGCCAUCUCCAAAACUAGAAUUGCCA	1568
45	UCAGAACAUGAAUGCAACUGGGAA-GAAAUAUUUCAGAAUCCUAAAAACAGUCCAGUAUUCUACAGGAAAAA .	1569
53	UCAGAAC--CGGAGCAACAGUUGAAUGAAAUUUAAAAGGAUUC----AACACA-AUGGCUGGAAGCUA-AGGAAGAA	1570
45	AAACAGAUGCCAGUAUUUCACAGGA 	1571
55	AAACAACUGCCAUGUCCUACAGGA	1572
45	AUUGGAAAGCCUGAAUCUG--CGGUGGCGGAGGUUGCA .	1573
57	AUUUGAAGCCAGU-UCUGACCGAGUGGAAG--CGUCUGCA	1574
45	CUGCAACAGCGUCAGACAGAAAAA 	1575
59	CUGCACTCCGCGUGACUGGCCAGAGAAAA	1576
45	CCUCAAAAACAGAUCCAGUAUUUCACAG	1577

53	. .	1590
	AACAGUUGAAUGAAA	
47	UGGAAAGUUGCCCCUGCGCCAGGGAA	1591
	
55	UGCAAACAGUUGCCCCUGGACCUGGAAA	1592
47	UUACUGGGAAGAGU-UGCCCCUG---CGCCAGGGAAUUCU	1593
	
57	UGACCAGUGGAAGCGUCUGACCCUUCUCUGCAGGAACUUCU	1594
47	UACUG-GUGG-AAGAGUUGCCCCUGCGCCAGGGAAUUCUGAAACAUAUAAGAAACUGGAGGACCCUGUCUUAAGCCGAGAGACAAG-AUJAAACUUGAAAUAAGCU----	
	//	
59	
	UACUGAGUGGAAAAUUGAACCCUGC-----ACUCCGUGACUGGCAGAGAAAAUAAGUAGAGACC--CUUGAAAGA-CUCCAGSACUUCAGAGGCCCGGAGCCUGGACCUCACAGCUGCGC	
	//	
	//CAAGCAGA	1595
	.	
	//CAAGCUGA	1596
47	UGGUGGAGAGUUGCCCCUGCGCCAGGGAAUUCUCAAAACAAUUAUAUGA	1597
	
60	UGGAGAGAAAUUGCGCCUCUGAAAGAGAACG-UGAGCCAGUCUAUGA	1598

48	GAUUUGAACCUCAAA-UAAAAGACC 	1599
49	GAUUAGCAGUUCAGCUAACAACC	1600
48	CUUGGCAGCUUGAAAAAAGCUUGAAGA 	1601
51	CUCUGCAGAUUCAACCGGGCUUGGACA	1602
48	UGAGAAACAA--GGA-GAAAUUGAAGCUCAAAUAATAAGACCUUGGCAC--UUGAAAAAAAGCUUGAAG 	1603
53	UCAGAAUCAGUGGGAUGAGUACAAGAACACCUUCAGAACCGGGAACAGUUGAAUUGAAUUGUUAAAG	1604
48	GCAGCUUUGAAAAAGCUUGAAGACCUUGAAGAGCAGUUAAAUAUCAUCUGCUCUGU 	1605
55	GGACCUUGAAAAGUUUCUUGCCUGGCUU--ACAGAAAGCUGAAAACAACUGCCAAUGU	1606
48	UUGAAGACCUUGAAGACAGUAAAUAUCAUCUGCUCUGU 	1607
57	UGAAAGCCAGUUCUGACCAGUGGAAGGUCUGCACCUUU	1608
48	GGAAAAUUGAGUCUCAAUAAAAGACCUUGGCAGCUUGAAAAAAGCUUGAAGACCUUGAA 	1609
59	GGAAAAUUGAACCUUGACUCCCGCUGACU--GGCAGA--GAAAAAUAGAU-GAGACCCUUGAA	1610

48	CAAGGAGAAAUUGAAGCUCAAUAAAAGACCUUGGGCAGCUUGAA 	1611
60	CGAGGAGAAUUGCGCCUCUGA-AAGAGAACGUGAGCCACGUCAA	1612
49	CAACCGGAUGGGA-AGAGAU 	1613
51	CAACCGGCUTGGACAGACUU	1614
49	UGAAAUAGAGUUAAGCUAAACAACCGGAUG 	1615
53	UGAAGUACAAGAACAC-CUUCAGAACCGGAGG	1616
49	GAAACUGAAAUAGCAGUUAAGCUAAACAACCGGAUGGAGAGAUU-UUGUCU 	1617
55	GAAACUCAUAGAUUACUGCAACAGUUCUCCUUGGACCGGAAAAAGUUUCUUGCCU	1618
49	AGCAGUUA--AGCUAACAA 	1619
57	AGCAGUUCAGACGACGACGA	1620
49	UCAAGCUAAAC-AACCGGAUGG--AAGAGAUUUUGUC 	1621
59	UCAAGCUGGCGAAGCUGAGGUGAUCAAGGGAUCCUGGC	1622

52	UUGAAAAAACAAGACCAGCAA--UCAAGAGGCUA 	1647
59	UUGAAAAGACU--CCAGGAACUUCAAGAGGCCA	1648
52	UGGAAGAUCUCAUJACC 	1649
60	UGGAAGACCUGAACACC	1650
53	CUGAGCAGGUCUUAGGACAGGCCAGAG 	1651
58	CAGACAGC-CUUUGGAAGACUAGAG	1652
54	CUGAAAUCUCCGGGAUUUCUCAG-AUGAUACCGAAAAG 	1653
55	CUGAAAACAACUIC--CAAUHCUACAGGAUGUACCGUAAGG	1654
54	CAGUGGCAGACAAAUGUAGAU 	1655
57	CAGAAGCAGACGAUGUACAU	1656
54	CUCCGCC-AGHGGCAGACAAAUGUAGAUUGGCAAAUGACUUGGCCUGAAACUUC 	1657
59	CUCCGCUGACUGGCAGAGAAAAUAGAUAGAGACCUCUUGAAAAGACUCCAGGAACUUC	1658

Tabla 3. Lista de secuencias de bases preferidas de los oligonucleótidos según la invención. Los oligonucleótidos que comprenden estas secuencias de bases son capaces de unirse a regiones sumamente similares (tramos de secuencia con una identidad >50 %) en dos exones de DMD diferentes (como se ilustra en la Tabla 2), y son capaces de inducir la omisión de estos dos exones y de cualquier exón entre ellos, para generar una transcripción de DMD en marco.

Compuesto	Secuencia*	SEQ ID NO
Primer exón 8 - Segundo exón 19		
PS830	GUGAUGUACAUAAGAUGGACUUC	1671
	GYGZYGZYZYZZZGYGGZXYX	1672
	YGGZXYXYZYXYGGZY	1722
	YXYGZZXYXYXZGXYY	1723
Primer exón 9 - Segundo exón 22		
	YXZGZGGYGGYGZYZZG	1724
	YXZYGYXGGYGZYZYZG	1725
Primer exón 9 - Segundo exón 30		
	YXYXZYZYXXYGYGXZGZXYG	1726
	GZZYXGZGGXYYZGGYGZZGZZG	1727
	YYXZGYXYXYGGGXZGZXYG	1728
	GZXYYXYGGZYZZGYGYZZGG	1729
Primer exón 10 - Segundo exón 13, 14, 15, 18, 20, 27, 30, 31, 32, 35, 42, 44, 47, 48, 55, 57 o 60		
PS811	CUUCCUCCGAAAGAUUGCAAAUUC	1673
	XYYXYXXGZZGZYGXZZZYX	1674
PS814	GACUUGUCUUCAGGAGCUUCC	1675
	GZXYYGYXYXZGGZGXYYXX	1676
PS815	CAAAUGACUUGUCUUCAGGAGCUUC	1677
	XZZYZGZXYGYXYXZGGZGXYYX	1678
PS816	CUGCCAAAUGACUUGUCUUCAGGAG	1679
	XYGXZZYZGZXYGYXYXZGGZG	1680
PS1168	CUGCCDDUGDCUUGUCUUCDGGDG	1681
PS1050	CCAAAUGACUUGUCU	1682
	CCAAAYGACYGYCY	1683
PS1059	CAAAUGACUUGUCUUCAGGAG	1684
PS1138	CAAAUGACUUGUCUUCAGGAG	1685
PS1170	CDDUGDCUUGUCUUCDGGDG	1686
	ZYGZXYGYXYXZGGZGGZG	1687
PS1016	CAGUCUCCUGGCAGACUGGAUGCUC	1688
	XZGYXYXYGGGXZGZXYGGZYGXYX	1689
	ZYGZZXYGXZZYZGZXYGYX	1690
	ZYZZGXYGXXZZXYGYGYX	1691
	GYXXZGGYXYZYXYXZY	1692
	GYXXZXYGYXYGXZZY	1693
	XYYXZZZGXGYYYGZ	1694
	XYYXYGZGGXZYYYGZ	1695
	YYYGZYZXGGYXXZGGYXYZYXYXZ	1696
	ZGGXZYYYGZGYGXGYXXZ	1697
	Primer exón 23 - Segundo exón 42	
	YXYXGZYZXYXYXYXZYZGY	1698
	GXGXYXYXYXGZYZXYX	1699
	ZZYXYXZGZGGGXGYXYXYX	1700
	YXYXZGYXZYXZXXZYXZYXGY	1701
	GGXZYGYXYXZGYXZYXZX	1702
	ZZYXYXZZZGGXZYGYXYX	1703

ES 2 758 982 T3

(continuación)

Compuesto	Secuencia*	SEQ ID NO
Primer exón 45 - Segundo exón 51		
	YGGXZYXYGYGYYYGGZGGZYGYG	1730
	YGGXZYXYGYGYYYGGZGGZYGYG	1731
Primer exón 45 - Segundo exón 53		
	YYXXZXZGYYGXZYXXZZYGYXYGZ	1732
	YYXZZXYGYGXXYXXZGYXYGZ	1733
	YYXXYGYZGZZYZXYGGXZYXYGY	1734
	YYXZZXYGYGXXYXXGGYXYGZ	1735
	XYYYZZXZYXXZYXXZZXYGYGYG	1736
	YYXYXXYXZGYXXZXGXZYGYGY	1737
Primer exón 45 - Segundo exón 55		
	UCCUGUAGAAUACUGGCAUCUGUUU	1704
	YXXYGYZGZZYZXYGGXZYXYGY	1705
PS1185	UCCUGUDGDDUDCUGGCDUCUGUUU	1706
PS1186	UCCUGUDGDDUDCUGGCDUCUGU	1707
	UCCUGUAGAAUACUGGCAUCUGU	1708
	YXXYGYZGZZYZXYGGXZYXYGY	1709
PS1187	UCCUGUDGGDUDUUGGCDGUUGUUU	1710
	UCCUGUAGGAUAUUGGCAGUUGUUU	1711
	YXXYGYZGGZYZYGGXZGYGY	1712
PS1188	UCCUGUDGGDUDUUGGCDGUUGU	1713
	UCCUGUAGGAUAUUGGCAGUUGU	1714
	YXXYGYZGGZYZYGGXZGYGY	1715
	UCCUGUAGGACAUUGGCAGUUGU	1716
	YXXYGYZGGZXZYGGXZGYGY	1717
	UCCUGUAGGACAUUGGCAGUUGUUU	1718
	YXXYGYZGGZXZYGGXZGYGY	1719
Primer exón 45 - Segundo exón 60		
	ZZYZXYGGXZYXYGYGYGZGG	1738
	XYGYZGZZYZXYGGXZYXYGY	1739
	GXYXXZYXYGGYGYXZGG	1740
	XYGXZGZZGYXXZYXYGGY	1741
Primer exón 56 - Segundo exón 60		
	YXYGYGYZGXYYXZZYXXZYXYGGZG	1720
	YCYXXZGZGGXGZZYXXZYXYGGZG	1721

*D = 2, 6-diaminopurina; C = 5-metilcitosina; X = C o 5-metilcitosina, Y = U o 5-metiluracilo; Z = A o 2, 6-diaminopurina

<p>PS1135 GUUGAGAAAGUUGCCUUCUUC</p>	<p>1819</p>
<p>Adicionales</p>	
<p>PS1498 C*UGCCAAU*ACUUGU*UUCAGGAG*</p>	<p>1887</p>
<p>CUGCCAAUUGACUUGUCU*<u>CAG</u>*A*GA*G</p>	<p>1888</p>
<p><u>C</u>*U*G*CCA*A*AU*GAC*UUGUCU*<u>U</u>*CAG*A*G*A*G</p>	<p>1889</p>
<p>PS1125 CUGAGAAAGUUGCCUUCUUCAGAAAG</p>	<p>1814</p>
<p>PS1407 CUGAGAAAGUUGCCUUCUUC</p>	<p>1820</p>
<p>PS1408 CUGAGAAAGUUGCCUUCUUC</p>	<p>1821</p>
<p>PS1409 CUGAGAAAGUUGCCUUCUUCGAA</p>	<p>1822</p>
<p>PS1410 UAAGUCUGAGAAAGUUGCCUUCUUC</p>	<p>1823</p>
<p>PS1411 CUGCCAAUUGACUUGUCUUC</p>	<p>1824</p>
<p>PS1412 AACUGCCAAUUGACUUGUCUUC</p>	<p>1825</p>
<p>PS1418 GUCUGDGDGUUGCCUUCUUC</p>	<p>1826</p>
<p>PS1445 GD<u>U</u>UG<u>U</u>CU<u>U</u>GDGGD<u>G</u>U<u>U</u>CC (PS814, ID NO: 1675)</p>	<p>1827</p>
<p>PS1446 CDD<u>D</u>UG<u>D</u>CU<u>U</u>GU<u>U</u>GDGGD<u>G</u>U<u>U</u>C (PS815, ID NO: 1677)</p>	<p>1828</p>
<p>PS1246 AUGACUGCCAAUUGACUUGUC</p>	<p>1780</p>
<p>PS1457 ACUUGUCUUCAGGAGCUUCCAAUUG</p>	<p>1781</p>
<p>PS1459 ACUUGUCUUCAGGAGCUUCDD<u>D</u>DUG (PS1457 mod)</p>	<p>1829</p>
<p>PS1461 A<u>C</u>UUG<u>U</u>CU<u>U</u>CA<u>G</u>GA<u>G</u>CU<u>U</u>CCAAUUG (PS1457 mod)</p>	<p>1830</p>
<p>PS1462 A<u>C</u>UUG<u>U</u>CU<u>U</u>CA<u>G</u>GD<u>G</u>CU<u>U</u>CCDD<u>D</u>DUG (PS1457 mod)</p>	<p>1831</p>

	<p>PS1458 GUCUUCAGGAGCUUCCAAUUG 1782</p> <p>PS1460 GUCUUCAGGDCUUCDDUUG (PS1458 mod) 1832</p>
	<p>PS1249 y derivados</p> <p>PS1249 CUUCUAAAAGCUGUUUUGA 1783 YXXYZZZGXGYYGZ 1833 CUUCUAAAAGCUGUUUUGA 1834 CUUCUDDDDGGCUGUUUUGD 1835</p>
	<p>PS811 CUUCUUCCGAAAGAUAUUGCAAUUC 1673, 1674</p>
10-30	<p>PS1245 y derivados (origen del exón 30)</p> <p>PS1245 AUAAGCUGCCAACUGCUUUGC 1784 ZYZZGXGXXZZXYGYGYX 1836</p> <p>PS1358 y derivados (origen del exón 30)</p> <p>PS1358 CUGGGCUUCUGAGGGCAUUUGAGCU 1786 XYGGGYXXYZGGXZYGYGZGX 1838</p> <p>PS816 y derivados (origen del exón 10) 1679-1681, 1812-1814</p>
	<p>Adicionales</p> <p>PS814 1675, 1676</p> <p>PS815 1677, 1678</p> <p>PS1246 AUGAACUGCCAAAUGACUUGUC 1780</p> <p>PS1359 AUUUGAGCUGCGGUCCACCUUGUCUG 1785</p>

2) 11/14 (78.6 %)

10 CAGCUUUAGAGAA SEQ ID NO: 1766
 |||..|||.||||
 18 CAGACUUAAAAGAA SEQ ID NO: 1767

3) 13/19 (68.4 %)

10 AUUCUAAUGAUGGGAAG SEQ ID NO: 1768
 |||..|||..|||
 18 AUUGCAAUCUUUCGGAAG SEQ ID NO: 1769

1) 41/70 (58.6 %)

10 GACAAGUCAUUUGGCAGUUCUAUUGAUGGAGAGUAAAGUAACCCUGGACCG//
 ||||| ||.|||||||.|| |.||||..||.|||||..
 30 GACAAG-CAGUUGGCAGCUUAU-----AUUGCAGACAAGGUGGACGC//
 //UUAUCAAAACAGCUUUAGAAG SEQ ID NO: 127
 ..|||||..||..|||
 //AGCUCAAUUGCCUCACAGGAAG SEQ ID NO: 128

COMBINACIONES DE EXONES ADICIONALES				
Combinación de exones	Región de identidad de exones (SEQ ID NO; véase la Tabla 2)	SEQ ID NO		
11-23	191-192	UCAGUUUCUUCUUCUUCUGAU	1794	
		YZGYYXXYZYXXYGZY	1861	
		UCAAUUUCUCAAUUUCUGAU	1795	
		YZZYXXYZZZZYXXYGZY	1862	
		CUUCAGUUUCUUCUUCUGAU	1796	
		XXYZGYYXXYZYXXYGZY	1863	
		CCUCAUUUCUCAAUUUCUGAU	1797	
		XXYZZYXXYZZZZYXXYGZY	1864	
		UACUUCAGUUUCUUCUUCUGAU	1798	
		YZXYXZGYYXXYZYXXYGZY	1865	
		UCCUCAUUUCUCAAUUUCUGAU	1799	
		YXXYZZYXXYZZZZYXXYGZY	1866	
		CUACCACCACUUGUGUGA	1808	
		XYZXXZZXXZYGYGZGZ	1867	
		CUGCCAACUGCUUGUCAUGA	1809	
XYGXXZZYGYGYZZYGZ	1868			
13-30	285-286	AGUUGCGUGAUCUCCACUAGA	1810	
		ZGYGXGYGZYXXYZYZGZ	1869	
		AGCUGGUCCACCUUGUCUGCA	1811	
		ZGYGXGYXXZYXXYGXZ	1870	
		UGAGAGAAUUGACCUUGACUUGU	1856	
		ACCAUGUGAGUGAGAAUUGACCCU	1857	
		ZXXZYGYGZGZGZZZYGZXXY	1872	

		CACCACCAUUGAGUGAGAGA	1858
		XZXXZZZYGYGZGZGZGZ	1873
		CUCCACUAGAUUCAACUAC	1859
		XYXXZYZGYZYZZYZX	1874
		UCUUCCAAAGCAGAGUUGCGUG	1860
		YXYXZZZGXZGXZGYGXGYG	1875
34-53	1294-1295	UCUGUAGCUGCCAGCCAUU	1800
		YXYGYZGYGXZGXZGY	1876
		UCCUAGCUUCCAGCCAUU	1801
		YXYYZGXYYXXZGXZY	1877
		UCUGUAGCUGCCAGCCAUUCUGU	1802
		YXYGYZGYGXZGXZGYXYGY	1878
		UCCUAGCUUCCAGCCAUUGUGU	1803
		YXYYZGXYYXXZGXZYGYGY	1879
40-53	1477-1478	UCUUGUACUGAUACCACUGAU	1804
		YXYGYZXYGZYZZXXZYGY	1880
		UCUUGUACUUAUCCACUGAU	1805
		YXYGYZXYXZYZZXXZYGY	1881
44-56	1557-1558	UCUCAGGAUUUGUGUCUUU	1806
		YXYZGGZZYYGYGYYYY	1882
		UCUCAGGAUUUUUGGUGU	1807
		YXYZGGZZYYYYGYGYGY	1883

Ejemplos 1-5 Materiales y métodos

El diseño de los oligonucleótidos se basó principalmente en la complementariedad inversa con respecto a tramos de secuencia específicos, sumamente similares en dos exones de DMD diferentes, según lo identificado por EMBOSS Matcher y como se describe en la Tabla 2. Otros parámetros de secuencia que se tuvieron en cuenta fueron la presencia de estructuras secundarias de ARN parcialmente abiertas/cerradas en dichos tramos de secuencia (según lo esperado usando la estructura de ARN, versión 4.5 o el programa Mfold para ARN, versión 3.5 (Zuker, M.) y/o la presencia de supuestos sitios de unión a proteína SR en dichos tramos de secuencia (según lo esperado usando el programa informático ESE-finder (Cartegni L, et al. 2002 y Cartegni L, et al, 2003). Todos los OAS se sintetizaron en Prosensa Therapeutics BV (Leiden, Países Bajos) o se obtuvieron de una fuente comercial (ChemGenes, US) y contienen cadenas principales de ARN 2'-O-metilo y fosforotioato (PS) de longitud completa. Todos los oligonucleótidos fueron ARN de 2'-O-metil fosforotioato y se sintetizaron en una escala de 10 µmol usando un sintetizador OP-10 (GE/ÅKTA Oligopilot), a través de protocolos estándar de fosforamidita. Los oligonucleótidos se escindieron y desprotegeron en una secuencia de dos etapas (DIEA seguido de tratamiento con NH₄OH conc.), se purificaron mediante HPLC y se disolvieron en agua y se añadió un exceso de NaCl para el intercambio de iones. Después de la evaporación, los compuestos se redisolviaron en agua, se desalinizaron mediante FPLC y se liofilizaron. La espectrometría de masas confirmó la identidad de todos los compuestos, y la pureza (determinada media UPLC) se consideró aceptable para todos los compuestos (> 80 %). Para los experimentos *in vitro* descritos en la presente memoria, se prepararon soluciones de trabajo 50 µM de los OAS en tampón fosfato (pH 7,0).

Cultivo de tejidos, transfección y análisis mediante RT-PCR

Se transfectaron miocitos sanos humanos diferenciados de control (miotubos) en placas de 6 pocillos a una concentración estándar de OAS de 400 nM, según procedimientos operativos estándar no GLP (siglas del inglés *Good Laboratory Practice*, prácticas correctas de laboratorio). Para la transfección, se usó polietilimina (ExGen500; Fermentas Países Bajos) (2 µl por µg de OAS, en NaCl 0,15 M). Los procedimientos de transfección mencionados anteriormente se adaptaron de los materiales y métodos previamente comunicados (Aartsma-Rus A., et al., 2003). Veinticuatro horas después de la transfección, el ARN se aisló y analizó mediante RT-PCR. Brevemente, para generar ADNc, en la reacción de transcriptasa inversa (RT, *reverse transcriptase*), se usó una mezcla aleatoria de hexámeros (1,6 µg/µl; Roche Países Bajos) en 500-1000 ng de ARN de entrada. Posteriormente, en cada muestra, se realizó un análisis de PCR en 3 µl de ADNc y se incluyó una PCR inicial y anidada usando cebadores específicos del gen de DMD (véanse las Tablas 4 y 5). El aislamiento de ARN y el análisis de RT-PCR se realizaron según procedimientos operativos estándar no GLP adaptados de materiales y métodos previamente comunicados (Aartsma-Rus A., et al., 2002; y Aartsma-Rus A., et al. 2003). Los productos de RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel (geles de agarosa al 2 %). Los fragmentos de RT-PCR resultantes se cuantificaron mediante análisis de ADN labochip (*Lab-on-a-Chip*) (Agilent Technologies USA; DNA 7500 LabChips). Los datos se procesaron con el programa informático "Agilent 2100 Bioanalyzer" y Excel 2007. La relación de los productos de transcripción más pequeños (que contenían la omisión multiexónica esperada) se evaluó con respecto a la cantidad total de productos de transcripción (que representan las eficacias de omisión en porcentajes), y se comparó directamente con la de las células no transfectadas. Los fragmentos de PCR también se aislaron de geles de agarosa (kit de extracción en gel QIAquick, Qiagen Países Bajos) para la verificación de las secuencias (secuenciación de Sanger, BaseClear, Países Bajos).

Tabla 4. Conjuntos de cebadores de PCR utilizados para detectar la omisión de los exones diana

Exones Diana	1ª PCR		2ª PCR	
	cebador directo	cebador inverso	cebador directo	cebador inverso
10 a 18	h7f	h20r	h8f	h19r
10 a 30	h7f	h32r	h8f	h31r
10 a 47	h8f	h50r	h9f	h49r
10 a 57	h8f	h64r	h9f	h63r2
45 a 55	h43f2	h57r	h44f	h56r

Tabla 5. Secuencias de los cebadores

ID del cebador	Secuencia (5' --> 3')
h7f	agtcagccacacaacgactg
h8f	caaggccacctaaagtgactaaa
h9f	gagctatgcctacacacagg
h43f2	cctgtggaagggtgaagc
h44f	gcgatttgacagatctgtg
h19r	gcatctgcagtttctgaac
h20r	actggcagaattcgatccac
h31r	tgtgcaacatcaatctgagac
h32r	tagacgctgctcaaaattgg

(continuación)

ID del cebador	Secuencia (5' --> 3')
h49r	cactggctgagtggtgg
h50r	tcagtcaggagctaggtc
h56r	cgctttgtaacaggactgc
h57r	tctgaactgctgaaagctg
h63r2	gagctctgtcatttgggatg
h64r	gggcctctgcagtcttcgga

(SEQ ID NO:1745-1759)

Resultados

Ejemplo 1. Direccionamiento del tramo de secuencia con alta similitud en los exones 10 y 18 con los OAS en sitios diferentes.

5 Basándose en un tramo de secuencia sumamente similar (63 %) en los exones 10 (SEQ ID NO: 109) y 18 (SEQ ID NO: 110), se diseñó una serie de OAS dispersos sobre dicho tramo de secuencia, 100 % complementario inverso con respecto al exón 10 (PS814; SEQ ID NO:1675, PS815; SEQ ID NO:1677, PS816; SEQ ID NO: 1679) o al exón 18 (PS811; SEQ ID NO:1673). Después de la transfección en cultivos de miotubos de control de ser humano sano, el análisis por RT-PCR demostró que los cuatro OAS podían inducir la omisión del exón 10 al 18 (confirmado por análisis de secuencia) (Fig. 1). PS811 y PS816 tenían los porcentajes de complementariedad inversa más altos con ambos exones (Fig. 1B) y fueron más eficaces con eficacias de omisión del exón 10 al 18 de 70 % y 66 % respectivamente (Fig. 1C). PS814 fue el menos eficaz, lo cual puede haber sido intrínseco a su localización y/o longitud más corta (21 frente a 25 nucleótidos) y, por lo tanto, menor afinidad o estabilidad de unión. En las células no tratadas (NT), no se observó omisión del exón 10 al 18. Estos resultados fueron sumamente reproducibles (omisión del exón 10 al 18 por PS816 en 20/20 transfecciones diferentes) y demuestran que la omisión de un tramo multiexónico del exón 10 al 18 es factible utilizando un mono OAS (oligonucleótido antisentido) que pueda unirse a los exones 10 y 18, en una región con alta similitud de secuencia (63 %), y que puede inducir la omisión de estos exones y de todos los exones entre ellos. Aunque en esta región de transcripción, se pueden obtener fragmentos adicionales de omisión multiexónica, en todos los experimentos, la transcripción resultante en la que el exón 9 se cortó y empalmó directamente con el 19 (una transcripción en marco), fue la más abundante.

Ejemplo 2. Direccionamiento del tramo de secuencia con alta similitud en el exón 10 y 18 con OAS de diferentes longitudes.

Dentro del tramo de secuencia sumamente similar en los exones 10 (SEQ ID NO: 109) y 18 (SEQ ID NO: 110) se evaluó el efecto de los OAS con diferentes longitudes para identificar la longitud mínima más eficaz. Después de la transfección de PS816 (un oligómero de 25 meros; SEQ ID NO:1679, PS1059 (un oligómero de 21 meros; SEQ ID NO: 1684) o PS1050 (un oligómero de 15 meros; SEQ ID NO: 1682) en miocitos humanos sanos de control (es decir, miotubos diferenciados), el análisis de RT-PCR demostró que los tres OAS podían inducir la omisión del exón 10 al 18 (confirmado por análisis de secuencia) (Fig. 2A, B). PS816 y PS1059 fueron más eficaces (68 % y 79 % respectivamente). La PS1050 más corta fue menos eficaz (25 %). En las células no tratadas (NT), no se observó omisión del exón 10 al 18. Estos resultados indican que la omisión de un tramo multiexónico del exón 10 al 18, es factible usando los OAS de 15, 21 y 25 nucleótidos. Se espera que los OAS de mayor longitud también funcionen. El PS1059 de 21 meros, el candidato de menor longitud, fue el más eficaz. El PS1050 de 15 meros fue menos eficaz, lo que puede haber sido intrínseco a su reducida complementariedad inversa con respecto al exón 18 (47 %; Fig. 2B) y/o estabilidad o afinidad de unión reducida al ARN diana. Se pueden requerir modificaciones de bases para mejorar la Tf y, por lo tanto, la afinidad de unión o la estabilidad del dúplex, de 15 meros para mejorar su bioactividad. En este experimento, el producto de transcripción resultante más abundante fue nuevamente aquel en el que el exón 9 se cortó y empalmó directamente con el 19 (una transcripción en marco).

Ejemplo 3. Direccionamiento del tramo de secuencia con alta similitud en los exones 10 y 18 con los OAS con química de bases modificada

40 Las características particulares de característica química de OAS elegida, influyen, al menos en parte, en el suministro de un OAS en la transcripción diana: vía de administración, bioestabilidad, biodistribución, distribución intratisular y captación y tránsito celular. Además, la optimización adicional de las características químicas de oligonucleótidos está concebida para mejorar la estabilidad y la afinidad de unión, mejorar la actividad, mejorar la seguridad y/o reducir el coste de productos reduciendo la longitud o mejorando los procedimientos de síntesis y/o purificación. Dentro del tramo de secuencia sumamente similar en los exones 10 (SEQ ID NO: 109) y 18 (SEQ ID NO: 110) en la presente memoria se evaluó el efecto de los OAS de ARN 2'-O-metilo con diferentes bases modificadas (tales como pirimidinas y 2, 6-diaminopurinas 5-sustituidas). Después de la transfección de PS816 (un OAS de ARN con 2'-O-metilo regular; SEQ ID NO:1679, PS1168 (PS816 pero con todas las Aes reemplazadas por 2, 6-diaminopurinas; SEQ ID NO:1681, PS1059 (un OAS de ARN con 2'-O-metilfosforotioato regular; SEQ ID NO:1684, PS1138 (PS1059 pero con todas las Ces reemplazadas por 5-metilcitosinas; SEQ ID NO: 1685) o PS1170 (PS1059 pero con todas las Aes reemplazadas por 2, 6-diaminopurinas; SEQ ID NO: 1686) (Fig. 3B) en miocitos humanos sanos de control (es decir, miotubos diferenciados), El análisis de RT-PCR demostró que los cinco OAS eran capaces de inducir la omisión del exón 10 al

18 (confirmado por análisis de secuencia) (Fig. 3). PS816 fue el más eficaz (88 %). Aunque en estas secuencias particulares, las modificaciones de bases no mejoraron mucho más la bioactividad, pueden tener un efecto más positivo sobre la biodistribución, estabilidad y/o seguridad, de tal manera que los compuestos menos eficaces siguen siendo favoritos para el desarrollo clínico. Estos resultados indican que la omisión de un tramo multiexónico del exón 10 al 18 es factible utilizando OAS con bases modificadas. En este experimento, el producto de transcripción resultante más abundante fue nuevamente aquel en el que el exón 9 se cortó y empalmó directamente con el 19 (una transcripción en marco).

Ejemplo 4. PS816 induce la omisión de otros tramos multiexónicos en marco

El tramo de secuencia sumamente similar en los exones 10 (SEQ ID NO: 109) y 18 (SEQ ID NO: 110) también está (parcialmente) presente en los exones 30 (SEQ ID NO: 128), 31 (SEQ ID NO: 130), 32 (SEQ ID NO: 132), 42 (SEQ ID NO: 152), 47 (SEQ ID NO: 158), 48 (SEQ ID NO: 160), 57 (SEQ ID NO: 170) y 60 (SEQ ID NO: 174) (Fig. 4A, B, Tabla 2). Por lo tanto, en la presente memoria nos centramos en la detección de diferentes omisiones de tramo multiexónico después de la transfección de PS816 (SEQ ID NO: 1679) 400 nM. Para esta finalidad usamos diferentes conjuntos de cebadores (Tabla 4 y 5). De hecho, con el análisis de RT-PCR, observamos la omisión del exón 10 al 30, exón 10 al 42, exón 10 al 47, exón 10 al 57 y/o del exón 10 al 60 en marco en múltiples experimentos (confirmado por análisis de secuencia), que no se observó en células no tratadas. Como ejemplo, la figura 4C muestra la omisión del exón 10 al 18, del exón 10 al 30 y del exón 10 al 47, inducida por PS816. A pesar de sucesos adicionales de omisión multiexónica (ya sea en marco o fuera de marco), la transcripción resultante en la que el exón 9 se cortó y empalmó directamente con el 19 (una transcripción en marco), fue la más reproducible y pareció ser la más abundante en todos los experimentos. Estos resultados confirman que se puede inducir la omisión multiexónica a través del gen de DMD usando un mono OAS que pueda unirse a un tramo de secuencia que sea sumamente similar entre dos exones diferentes y que pueda inducir la omisión de estos exones y de todos los exones entre ellos, para generar una transcripción de DMD en marco.

Ejemplo 5. Direccinamiento de un tramo de secuencia con alta similitud en los exones 45 y 55 con OAS con características químicas de bases modificadas.

Basándose en un tramo de secuencia sumamente similar (80 %) en los exones 45 (SEQ ID NO: 1571) y 55 (SEQ ID NO: 1572), se diseñó una serie de OAS dispersos sobre dicho tramo de secuencia, 100 % complementario inverso con respecto al exón 45 (PS1185; SEQ ID NO: 1706, PS1186; SEQ ID NO: 1707) o 96 % con respecto al exón 55 (con un emparejamiento erróneo) (PS1188; SEQ ID NO: 1713) (Fig. 5A). En los tres OAS, las Aes se reemplazaron por 2, 6-diaminopurinas. Después de la transfección en cultivos de miotubos de control de ser humano sano, El análisis de RT-PCR demostró que PS1185, PS1186 y PS1188 fueron capaces de inducir la omisión del exón 45 al 55 (confirmado por análisis de secuencia) (Fig. 5B). En las células no tratadas (NT), no se observó omisión del exón 45 al 55. Estos resultados demuestran que la omisión de otro tramo multiexónico, del exón 45 al 55, es factible usando un mono OAS que pueda unirse a los exones 45 y 55, en una región con alta similitud de secuencia (80 %), y que puede inducir la omisión de estos exones y de todos los exones entre ellos. La transcripción resultante en la que el exón 44 se cortó y empalmó directamente con el 56 estaba en marco y se observó en múltiples experimentos. En cuanto a los experimentos de omisión del exón 10 al 18 (ejemplo 3) en la presente memoria mostramos nuevamente que los OAS con bases modificadas se pueden aplicar de manera eficaz. Asimismo, los resultados obtenidos con PS1188 indican que no es necesario que los OAS sean 100 % complementarios inversos con respecto a uno de los exones diana, si no que también pueden diseñarse como estructuras híbridas, en las que no hay complementariedad inversa del 100 % con respecto a ninguno de los exones diana.

Leyendas de las figuras

Figura 1. A) Localización de PS811 (SEQ ID NO: 1673), PS814 (SEQ ID NO: 1675), PS815 (SEQ ID NO: 1677) y PS816 (SEQ ID NO: 1679) en el tramo de secuencia que es sumamente similar (63 %) en el exón 10 y el exón 18. B) Características y eficiencias de OAS. Se indica el porcentaje de complementariedad inversa (comp. inv.) de cada OAS con el exón 10 o el exón 18. C) Análisis de RT-PCR. En miocitos sanos humanos (es decir, miotubos diferenciados) los cuatro OAS fueron eficaces induciendo la omisión de un tramo multiexónico desde el exón 10 al exón 18. PS811 y PS816 fueron los más eficaces. Los cuadros a la izquierda de la figura representan el contenido de los productos de transcripción amplificados por PCR. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas)

Figura 2. A) Análisis de RT-PCR. En miocitos sanos humanos (es decir, miotubos diferenciados), se analizaron OAS con diferentes longitudes, pero con la misma secuencia diana núcleo dentro del tramo de secuencia que es sumamente similar (63 %) en el exón 10 y el exón 18. PS816 (SEQ ID NO: 1679), un oligómero de 25 meros y PS1059 (SEQ ID NO: 1684), un oligómero de 21 meros, fueron más eficaces (68 % y 79 % de omisión del exón 10 al 18 respectivamente). El PS1050 de 15 meros (SEQ ID NO: 1682) fue el menos eficaz. Los cuadros a la izquierda de la figura representan el contenido de los productos de transcripción amplificados por PCR. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas) B) Características y eficacias de los OAS. Se indica el porcentaje de complementariedad inversa (comp. inv.) de cada OAS con el exón 10 o el exón 18.

Figura 3. A) Análisis de RT-PCR. En miocitos sanos humanos (es decir, miotubos diferenciados), Se analizaron OAS con diferentes características químicas de bases: PS816 (un OAS de ARN con 2'-O-metilfosforotioato regular; SEQ ID

NO:1679, PS1168 (PS816 pero con todas las Aes reemplazadas por 2, 6-diaminopurinas; SEQ ID NO:1681, PS1059 (un OAS de ARN con 2'-O-metilfosforotioato regular; SEQ ID NO:1684, PS1138 (PS1059 pero con todas las Ces reemplazadas por 5-metilcitosinas; SEQ ID NO: 1685) o PS1170 (PS1059 pero con todas las Aes reemplazadas por 2, 6-diaminopurinas; SEQ ID NO:1686). En todos los OAS analizados, se observó la omisión de los exones 10 al 18. PS816 fue el más eficaz (88 %). En estas secuencias específicas, las modificaciones de bases no mejoraron mucho más la bioactividad. Los cuadros a la izquierda de la figura indican el contenido de los productos de transcripción amplificados por PCR. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas) B) Características y eficacias de los OAS.

Figura 4. A) Tramos de secuencia sumamente similares en los exones 10, 18, 30 y 47, como dianas múltiples para PS816. Las SEQ ID NO se refieren a alineamientos de exones de longitud completa utilizando EMBOSS (como en la Tabla 2). La parte de secuencia que no se incluyó en el alineamiento EMBOSS, pero que es adyacente a la parte con alta complementariedad inversa a PS816, se muestra en color gris. B) Visión general de los porcentajes de alineamiento de los exones y de complementariedad inversa (comp. inv.) de PS816. C) Análisis de RT-PCR. PS816 puede inducir la omisión de tramos multiexónicos, identificada en la presente memoria como omisión de exones 10 al 18, exones 10 al 30 y exones 10 al 47. Las transcripciones resultantes están en marco. Estas no se detectaron en células no tratadas (NT). Los cuadros a la izquierda y a la derecha de la figura representan el contenido de los productos de transcripción amplificados por PCR. (M: Marcador de tamaño de ADN)

Figura 5. A) Localización de PS1185 (SEQ ID NO: 1706), PS1186 (SEQ ID NO: 1707) y PS1188 (SEQ ID NO: 1713) en el tramo de secuencia que es sumamente similar (80 %) en el exón 45 y el exón 55. La tabla resume OAS característicos. Se indica el porcentaje de complementariedad inversa (comp. inv.) de cada OAS con el exón 45 o el exón 55. B) Análisis de RT-PCR. En miocitos humanos sanos (es decir, miotubos diferenciados) los tres OAS fueron eficaces al inducir la omisión de un tramo de múltiples exones desde el exón 45 al exón 55. Los cuadros a la izquierda de la figura representan el contenido de los productos de transcripción amplificados por PCR. (M: marcador de tamaño de ADN; NT: células no tratadas)

25

Lista de referencias

- Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, Janson AA, den Dunnen JT, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy. See 1 article found using an alternative search: *Neuromuscul Disord*. 2002; 12:S71-7.
- 5 Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Baas F, van Ommen GJ, van Deutekom JC. Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum Mol Genet*. 2003; 12(8):907-14.
- Aartsma-Rus A, Janson AA, Kaman WE, Bremmer-Bout M, van Ommen GJ, den Dunnen JT, van Deutekom JC. Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am. J. Hum. Genet*. 2004; Jan 74(1):83-92.
- 10 Alloza I et al., *Genes Immun* 2012; 13(3):253-257
- Abeliovich A et al., *J Neurochem* 2006; 99:1062-1072
- van Ommen GJ, van Deutekom J, Aartsma-Rus A. The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping. *Curr Opin Mol Ther*. 2008; 10(2):140-9.
- 15 Andrade MA, Perez-Iratxeta C, Ponting CP. Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J Struct Biol*. 2001; 134(2-3):117-31.
- Arai K, Uchiyama N, Wada T. Synthesis and properties of novel 2'-O-alkoxymethyl-modified nucleic acids. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011; 21(21):6285-7.
- 20 Béroud C, Tuffery-Giraud S, Matsuo M, Hamroun D, Humbertclaude V, Monnier N, Moizard MP, Voelckel MA, Calemard LM, Boisseau P, Blayau M, Philippe C, Cossée M, Pagès M, Rivier F, Danos O, Garcia L, Claustres M. Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63 % of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mutat*. 2007; Feb;28(2): 196-202.
- Bomont P et al., *Nat Genet* 2000; 26(3):370-374
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3(4):285-98.
- 25 Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13):3568-71.
- Chabriat H et al., *Lancet Neurol* 2009; 8(7):643-653
- 30 Cheng AJ y Van Dyke MW. Oligodeoxyribonucleotide length and sequence effects on intramolecular and intermolecular G-quartet formation. *Gene*. 1997; 197(1-2):253-60.
- Cirak S, Arechavala-Gomez V, Guglieri M, Feng L, Torelli S, Anthony K, Abbs S, Garraida ME, Bourke J, Wells DJ, Dickson G, Wood MJ, Wilton SD, Straub V, Kole R, Shrewsbury SB, Sewry C, Morgan JE, Bushby K, Muntoni F. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet*. 2011; 378(9791): 595-605.
- 35 Cirak S et al., *Brain* 2010; 133(Pt 7):2123-2135
- Diebold SS, Masacrier C, Akira S, Paturel C, Morel Y, Reis e Sousa C. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol*; 2006; 36(12): 3256-67.
- Dhanoa BS et al., *Hum Genomics* 2013; 7(1):13
- 40 Dorn A, Kippenberger S. Clinical application of CpG-, non-CpG-, and antisense oligodeoxynucleotides as immunomodulators. *Curr Opin Mol Ther*. 2008; 10(1):10-20.
- Dubosq-Bidot L et al, *Eur Heart J* 2009; 30(17):2128-2136
- Ehmsen J. et al, *J. Cell Sci*. 2002, 115 (Pt4): 2801-2803.
- Fiorillo C et al., *Neurogenetics* 2012; 13(3):195-203
- Friedman JS et al., *Am J Hum genet* 2009; 84(6):792-800
- 45 Goemans NM, Tulinius M, van den Akker JT, Burm BE, Ekhardt PF, Heuvelmans N, Holling T, Janson AA, Platenburg GJ, Sipkens JA, Sitsen JM, Aartsma-Rus A, van Ommen GJ, Buyse G, Darin N, Verschuuren JJ, Campion GV, de

- Kimpe SJ, van Deutekom JC. Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med.* 2011;364(16): 1513-22.
- Goyenvalle A, Wright J, Babbs A, Wilkins V, Garcia L, Davies KE. Engineering Multiple U7snRNA Constructs to Induce Single and Multiexon-skipping for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* Junio de 2012, 20(6): 1212-21.
- 5 Heemskerk H, de Winter C, van Kuik P, Heuvelmans N, Sabatelli P, Rimessi P, Braghetta P, van Ommen GJ, de Kimpe S, Ferlini A, Aartsma-Rus A, van Deutekom JC. Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense oligonucleotides in the mdx mouse model. *Mol Ther.* 2010; 18(6):1210-7.
- Heneka MT et al., *Nature*2013; 493(7434):674-678
- Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul Disord.* 2006; 16(9-10):591-602.
- 10 Hovnanian A, *Cell Tissue Res* 2013; 351(2):289-300
- Huang JY et al., *Hum Reprod* 2013; 28(4):1127-1134
- Knauf F et al., *Kidney Int* 2013; doi: 10.1038/ki.2013.207
- 15 Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Obispo GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995; 374(6522):546-9.
- Krieg, A.M. The role of CpG motifs in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 2000; 12: 35-43.
- Kumar L, *Pharm. Technol.* 2008, 3, 128.
- Louis-Dit-Picard H et al., *Nat Genet* 2012; 44(4):456-460
- 20 Macaya RF, Waldron JA, Beutel BA, Gao H, Joesten ME, Yang M, Patel R, Bertelsen AH, Cook AF. Structural and functional characterization of potent antithrombotic oligonucleotides possessing both quadruplex and duplex motifs. *Biochemistry.* 1995; 34(13):4478-92.
- Manzur AY, Kuntzer T, Pike M, Swan A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008; (1):CD003725.
- Monaco A.P., et al., *Genomics* 1988; 2: 90-95.
- 25 Peacock H, Fucini RV, Jayalath P, Ibarra-Soza JM, Haringsma HJ, Flanagan WM, Willingham A, Beal PA. Nucleobase and ribose modifications control immunostimulation by a microRNA-122-mimetic RNA. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133(24): 9200-3.
- Mollie A et al., *Hum Genet* 2011; 129(6):641-654
- Moller RS et al., *Epilepsia* 2013; 54(2):256-264 Noris P et al, *Blood* 2011; 117(24):6673-6680
- 30 Popovic PJ, DeMarco R, Lotze MT, Winikoff SE, Bartlett DL, Krieg AM, Guo ZS, Brown CK, Tracey KJ, Zeh HJ 3rd. High mobility group B1 protein suppresses the human plasmacytoid dendritic cell response to TLR9 agonists. *J of Immunol* 2006; 177: 8701-8707.
- Puente XS et al., *Nature* 2011; 475(7354):101-105
- Raciti GA et al., *Diabetologia* 2011; 54(11):2911-2922
- 35 Rantamaki T et al., *Am J Hum Genet* 1999; 64(4):993-1001
- Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20^a edición. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2000
- Sirmaci A et al., *Am J Hum Genet* 2011; 89(2):289-294
- Stuart HM et al., *Am J Hum Genet* 2013; 92(2):259-264
- 40 Suzuki K, Hazlo, Imanishi T, Kodama T, Tanaka T. Oligonucleotide aggregates bind to the macrophage scavenger receptor. *Eur J Biochem.* 1999; 260(3):855-60.
- Uchida K et al., *Immunology* 2005; 116(1):53-63
- van Deutekom JC, Janson AA, Ginjaar IB, Frankhuizen WS, Aartsma-Rus A, Bremmer-Bout M, den Dunnen JT, Koop K, van der Kooi AJ, Goemans NM, de Kimpe SJ, Ekhart PF, Venneker EH, Platenburg GJ, Verschuuren JJ, van Ommen GJ. Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N Engl J Med.* 2007; 357(26):2677-86.

van Vliet L, de Winter CL, van Deutekom JC, van Ommen GJ, Aartsma-Rus A. Assessment of the feasibility of exon 45-55 multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Med Genet.* 1 de diciembre de 2008; 9:105.

Wagner, H., Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger *Adv. Immunol.* 1999; 73: 329-368.

Yokota T, Duddy W, Partridge T. Optimizing exon skipping therapies for DMD. *Acta Myol.* 2007; 26(3):179-84.

5 Yokota T, Hoffman E, Takeda S. Antisense oligo-mediated multiple exon skipping in a dog model of duchenne muscular dystrophy. *Methods Mol Biol.* 2011;709:299-312.

Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31 (13), 3406-3415.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diseñar un oligonucleótido para producir una proteína funcional o semifuncional, en donde dicho método comprende las siguientes etapas:
- 5 (a) identificar una combinación en marco de un primer y un segundo exón en un mismo pre-ARNm, en donde una región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con una región de dicho primer exón;
- (b) diseñar un oligonucleótido que sea capaz de unirse a dicha región de dicho primer exón y a dicha región de dicho segundo exón;
- 10 (c) en donde dicha unión da como resultado la omisión de dicho primer y dicho segundo exones, preferiblemente la omisión de un tramo multiexónico que comienza con dicho primer exón y abarca uno o más exones presentes entre dicho primer y dicho segundo exones y como máximo la omisión de todo el tramo de exones entre dicho primer y dicho segundo exones, y
- (d) en donde dicho método da lugar a un oligonucleótido.
2. Un método según la reivindicación 1, en donde el oligonucleótido es capaz de unirse a una parte de una región dentro de un primer exón y a una parte de una región dentro de una segunda región.
- 15 3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en donde la unión de dicho oligonucleótido es capaz de interferir con al menos una secuencia reguladora de corte y empalme en dichas regiones de dichos primer y segundo exones y/o con la estructura secundaria que abarca al menos dicho primer y/o dicho segundo exón en dicho pre-ARNm, preferiblemente, en donde dicha secuencia reguladora de corte y empalme comprende un potenciador de corte y empalme exónico (ESE), una secuencia de reconocimiento de exones (ERS) y/o un sitio de unión para una proteína de serina-arginina (SR).
- 20 4. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de todo el tramo de exones entre dicho primer exón y dicho segundo exón.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho oligonucleótido comprende de 10 a 40 nucleótidos.
- 25 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho oligonucleótido comprende al menos una modificación en comparación con un oligonucleótido basado en ribonucleótido o desoxirribonucleótido de origen natural, más preferiblemente
- 30 (a) al menos una modificación de bases, preferiblemente seleccionada de 2-tiouracilo, 2-tiotimina, 5-metilcitosina, 5-metiluracilo, timina, 2, 6-diaminopurina, más preferiblemente seleccionada de 5-metilpirimidina y 2, 6-diaminopurina; y/o
- (b) al menos una modificación de azúcar, preferiblemente seleccionada de 2'-O-metilo, 2'-O-(2-metoxi)etilo, 2'-O-desoxi (ADN), 2'-F, morfolino, un nucleótido con puente o BNA, o el oligonucleótido comprende nucleótidos con puente y nucleótidos 2'-desoxi modificados (mezcla de oligómeros de BNA/ADN), más preferiblemente la modificación de azúcar es 2'-O-metilo; y/o
- 35 (c) al menos una modificación de la cadena principal, preferiblemente seleccionada de fosforotioato o fosforodiamidato, más preferiblemente, la modificación de la cadena principal es de fosforotioato.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho oligonucleótido comprende uno o más grupos conjugados, opcionalmente protegidos, seleccionados del grupo que consiste en péptidos, proteínas, hidratos de carbono, fármacos, residuos de direccionamiento, residuos que mejoran la absorción, residuos que mejoran la solubilidad, residuos que mejoran la farmacodinámica, residuos que mejoran la farmacocinética, polímeros, derivados de etilenglicol, vitaminas, lípidos, residuos de polifluoroalquilo, esteroides, colesterol, residuos fluorescentes, moléculas indicadoras, residuos marcados radiactivamente y combinaciones de los mismos, conectados directamente o a través de un enlazador divalente o multivalente, a un resto terminal o interno.
- 40 8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho primer y segundo exones se seleccionan de los exones 10, 18, 30, 8, 9 11, 13, 19, 22, 23, 34, 40, 42, 44, 45, 47, 51, 53, 55, 56, 57 o 60 de pre-ARNm de distrofina.
9. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 12, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 44, 46, 47, 48, 49, 51, 53, 55, 57, 59 o 60.
- 50 10. Un método según la reivindicación 8 o 9, en donde el oligonucleótido es capaz de inducir la omisión de los exones 10 a 18, exones 10 a 30, exones 10 a 42, exones 10 a 47, exones 10 a 57, exones 10 a 60, exones 8 a 19, exones 9 a 22, exones 9 a 30, exones 11 a 23, exones 13 a 30, exones 23 a 42, exones 34 a 53, exones 40 a 53, exones 44 a

56, exones 45 a 51, exones 45 a 53, exones 45 a 55, exones 45 a 60 y/o exones 56 a 60 de distrofina.

11. Un oligonucleótido antisentido obtenible mediante el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho oligonucleótido puede unirse a una región dentro de un primer exón y a una región dentro de un segundo exón, en donde dicha región de dicho segundo exón tiene una identidad de al menos 50 % con dicha región de dicho primer exón,
 5 en donde dicho primer y dicho segundo exones están dentro de un mismo pre-ARNm de distrofina en dicho sujeto, en donde dicha unión de dicho oligonucleótido puede interferir con al menos una secuencia reguladora de corte y empalme en dichas regiones de dichos primer y segundo exones y/o con la estructura secundaria que abarca al menos dicho primer y/o dicho segundo exón en dicho pre-ARNm,
 10 en donde dicha secuencia reguladora de corte y empalme comprende un potenciador de corte y empalme exónico (ESE), una secuencia de reconocimiento de exones (ERS) y/o un sitio de unión para una proteína de serina-arginina (SR), o y/o
 15 en donde dicha unión de dicho oligonucleótido da como resultado la omisión de dicho primer exón y de dicho segundo exón, preferiblemente, la omisión de un tramo multiexónico que comienza con dicho primer exón y abarca uno o más exones presentes entre dicho primer y dicho segundo exones y, a lo sumo, la omisión de todo el tramo de exones entre dicho primer y dicho segundo exones,
 en donde se obtiene una transcripción en marco que permite la producción de una distrofina funcional o semifuncional y
 20 en donde dicha secuencia de oligonucleótidos no es parte de un cóctel o de una combinación de dos o más secuencias de oligonucleótidos distintas posiblemente ligadas con uno o más enlazadores, en donde dicho primer y segundo exones se definen de la siguiente manera:

- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el 18,
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el 30,
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el 42,
- 25 - el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el 47,
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el 57, o
- el primer exón es el exón 10 y el segundo exón es el 60.

12. Un oligonucleótido según la reivindicación 11, en donde:

- 30 - la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 109 y la región del exón 18 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 110 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 18;
- la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1766 y la región del exón 18 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1767 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 18;
- la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1768 y la región del exón 18 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1769 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 18;
- 35 - la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 127 y la región del exón 30 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 128 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 30;
- la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1772 y la región del exón 30 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 1773 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 30;
- 40 - la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 151 y la región del exón 42 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 152 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 42;
- la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 157 y la región del exón 47 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 158 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 47;
- la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 169 y la región del exón 57 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 170 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 57; o
- 45 - la región del exón 10 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 173 y la región del exón 60 comprende o consiste en la SEQ ID NO: 174 cuando dicho primer exón es el exón 10 y dicho segundo exón es el exón 60.

13. Un oligonucleótido según la reivindicación 11 o 12, que comprende la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1673-1681, 1684-1686, 1688, 1689, 1778, 1780-1787, 1812-1851 o 1884-1891, y que tiene una longitud, que se define por el número de nucleótidos presentes en dicha secuencia de bases o que tiene una longitud mayor de 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos.
 50

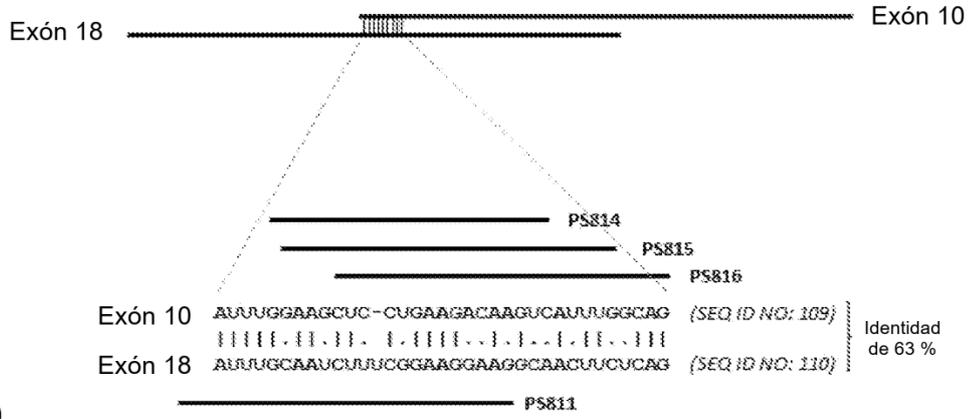
14. Un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que comprende parte de la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1673-1681, 1684-1686, 1688, 1689, 1778, 1780-1787, 1812-1851 o 1884-1891 en donde dicha parte corresponde a la secuencia de bases como se define en cualquiera de dichas secuencias con 1, 2, 3, 4 o 5 nucleótidos menos que los definidos en dicha secuencia de bases.

- 5 15. Un oligonucleótido según la reivindicación 14, que comprende:
- (a) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1679 a 1681, 1778, 1812, 1813, 1884 a 1886, 1890 o 1891, y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o la SEQ ID NO: 1814 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - 10 (b) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1688, 1689 o 1839 a 1844, y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - (c) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1673 o 1674 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - (d) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1675 o 1676 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - 15 (e) la secuencia de bases como se define en las SEQ ID NO: 1677 o 1678 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - (f) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1684 a 1686 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos; o
 - 20 (g) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1815 a 1819 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (h) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1820, 1824, y que tiene una longitud de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (i) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1826, 1780, 1782, 1832 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 25 (j) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1821, 1825 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (k) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1822 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 30 (l) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1823, 1781, 1829, 1830, 1831 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (m) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1783, 1833, 1834, 1835 y que tiene una longitud de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (n) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1887 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 35 (o) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1888 o 1889 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (p) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1827 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 40 (q) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1828 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (r) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1784, 1836 y que tiene una longitud de 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (s) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1786, 1838 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - 45 (t) la secuencia de bases como se define en la SEQ ID NO: 1780 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
 - (u) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1785, 1837 y que tiene una longitud de 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o

- (v) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1845, 1846, 1847, 1848 y que tiene una longitud de 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- (w) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1849, 1850 y que tiene una longitud de 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos, o
- 5 (x) la secuencia de bases como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1787, 1851 y que tiene una longitud de 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.
16. Un oligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15, para su uso como un medicamento para prevenir, retrasar, mejorar y/o tratar una enfermedad en un sujeto.
- 10 17. Una composición que comprende un monooligonucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 11-15 y que opcionalmente comprende además un vehículo, un diluyente, un excipiente, una sal, un adyuvante y/o un disolvente, farmacéuticamente aceptable, preferiblemente en donde dicha composición comprende dos o más oligonucleótidos idénticos como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 ligados por un contraión, preferiblemente calcio, más preferiblemente en donde dicha composición es para su uso como un medicamento para prevenir, retrasar, mejorar y/o tratar en su sujeto la DMD o la DMB.

15

Fig. 1a



b

Compuesto	Longitud	Secuencia	Exón 10 comp. rev.	Exón 18 comp. rev.	Omisión 10-18 Eficacia
PS811	25-meros	CUU CCU UCC GAA AGA UUG CAA AUU C	60%	100%	70%
PS814	21-meros	GAC UUG UCU UCA GGA GCU UCC	100%	57%	<5%
PS815	25-meros	CAA AUG ACU UGU CUU CAG GAG CUU C	100%	56%	38%
PS816	25-meros	CUG CCA AAU GAC UUG UCU UCA GGA G	100%	60%	66%

c

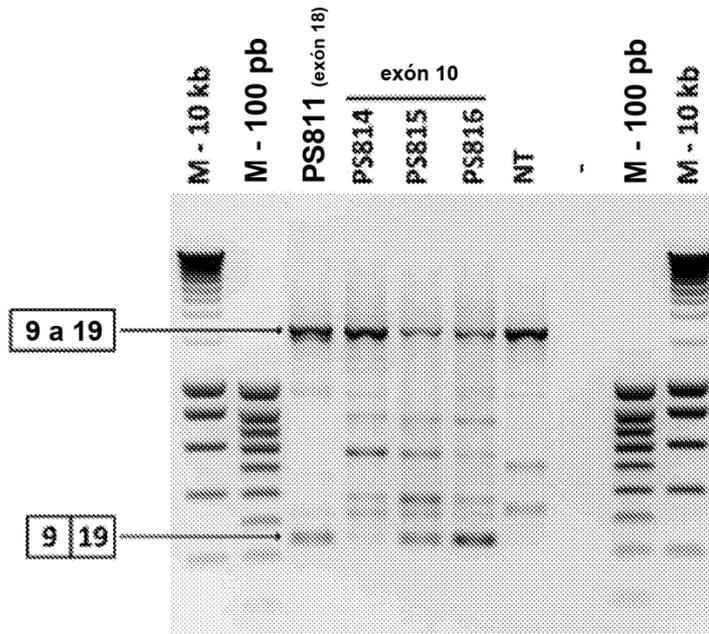
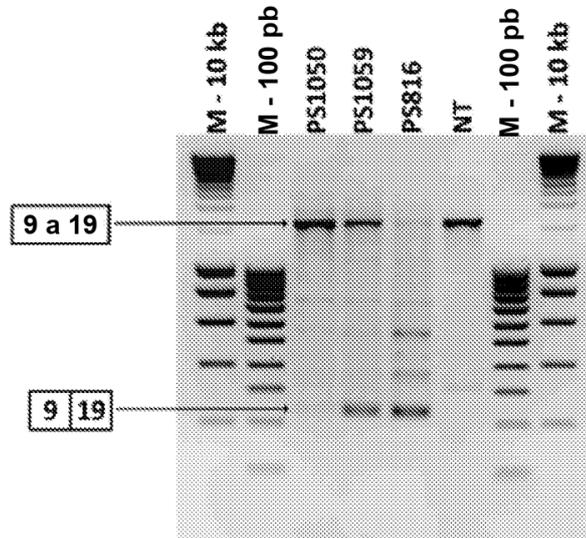


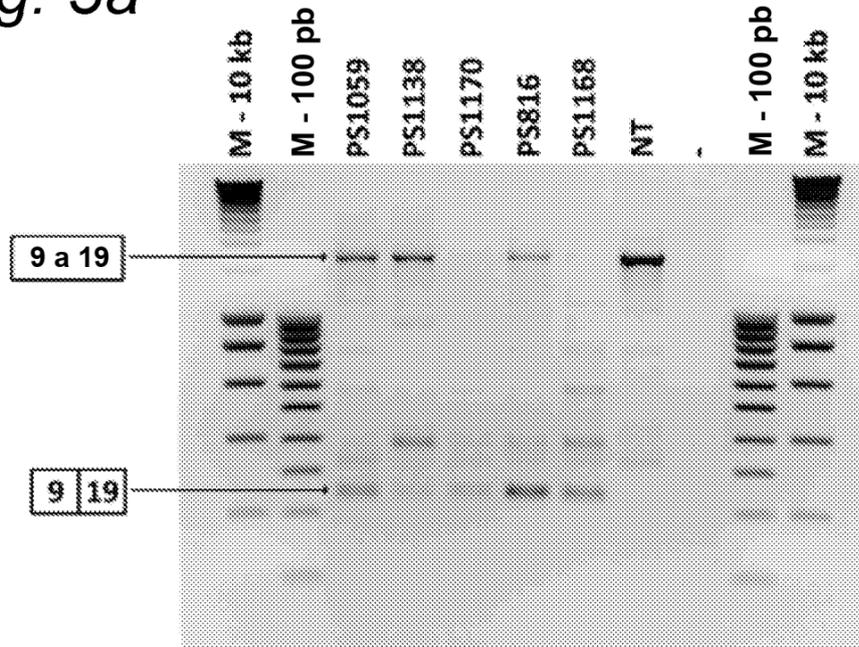
Fig. 2a



b

Compuesto	Longitud	Secuencia	Exón 10 comp. rev.	Exón 18 comp. rev.	Omisión 10-18 Eficacia
PS816	25-meros	CUG CCA AAU GAC UUG UCU UCA GGA G	100%	60%	68%
PS1050	15-meros	CCA AAU GAC UUG UCU	100%	47%	25%
PS1059	21-meros	CA AAU GAC UUG UCU UCA GGA G	100%	57%	79%

Fig. 3a

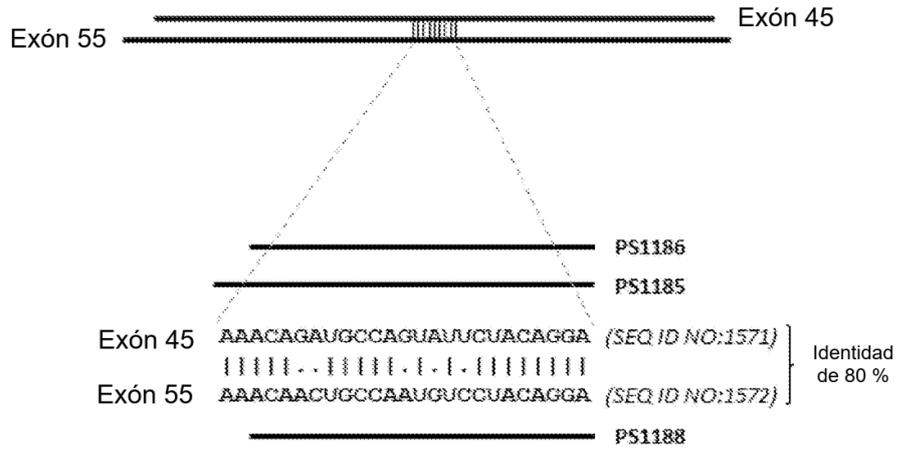


b

Compuesto	Longitud	Secuencia*	Omisión 10-18 Eficacia
PS816	25-meros	CUG CCA AAU GAC UUG UCU UCA GGA G	88%
PS1168	25-meros	CUG CCD DDU GDC UUG UCU UCD GGD G	61%
PS1059	21-meros	CA AAU GAC UUG UCU UCA GGA G	65%
PS1138	21-meros	CA AAU GAC UUG UCU UCA GGA G	27%
PS1170	21-meros	CD DDU GDC UUG UCU UCD GGD G	65%

*D = 2,6-diaminopurina; C = 5-metilcitosina

Fig. 5a



b

Compuesto	Longitud	Secuencia*	Exón 45 comp. rev.	Exón 55 comp. rev.
PS1185	25-meros	UCC UGU DGD DUD CUG GCD UCU GUU U	100%	80%
PS1186	23-meros	UCC UGU DGD DUD CUG GCD UCU GU	100%	78%
PS1188	23-meros	UCC UGU DGG DUD UUG GCD GUU GU	78%	96%

*D = 2,6-diaminopurina

c

