(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 908 962**

(51) Int. CI.:

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2015 PCT/NL2015/050421**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15190922**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2015 E 15732985 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.12.2021 EP 3155100**

(54) Título: **Oligonucleótidos antisentido útiles en el tratamiento de la enfermedad de Pompe**

(30) Prioridad:

10.06.2014 WO PCT/NL2014/050374
21.07.2014 EP 14177884
04.09.2014 EP 14183589

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.05.2022

(73) Titular/es:

ERASMUS UNIVERSITY MEDICAL CENTER ROTTERDAM (100.0%)
Dr. Molewaterplein 50
3015 GE Rotterdam, NL

(72) Inventor/es:

BERGSMA, ATZE JACOBUS;
VAN DER WAL, ERIK;
PIJNAPPEL, WILHELMUS WENCESLAUS MATTHIAS;
VAN DER PLOEG, ANTJE TJITSKE y
REUSER, ARNOLDUS

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

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

Oligonucleótidos antisentido útiles en el tratamiento de la enfermedad de Pompe

La invención se relaciona con oligonucleótidos antisentido que son útiles para el tratamiento de la enfermedad de Pompe y con composiciones farmacéuticas que comprenden los oligonucleótidos antisentido. La invención también se relaciona con un método para modular el empalme del pre-ARNm del gen GAA y para el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

Antecedentes

La enfermedad de Pompe, también conocida como deficiencia de maltasa ácida o enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, es un trastorno metabólico autosómico recesivo que daña las células musculares y nerviosas de todo el cuerpo. Es causada por una acumulación de glucógeno en el lisosoma debido a una deficiencia de la enzima alfa-glucosidasa ácida lisosomal. La acumulación de glucógeno provoca una debilidad muscular progresiva (miopatía) en todo el cuerpo y afecta a varios tejidos corporales, especialmente al corazón, los músculos esqueléticos, el hígado y el sistema nervioso.

En la enfermedad de Pompe, una proteína, la alfa-glucosidasa ácida (EC 3.2.1.20), también conocida como maltasa ácida, que es una hidrolasa lisosomal, es defectuosa. La proteína es una enzima que normalmente degrada los enlaces alfa-1,4 y alfa-1,6 en el glucógeno, la maltosa y la isomaltosa y es necesaria para la degradación del 1-3 % del glucógeno celular. La deficiencia de esta enzima da como resultado la acumulación de glucógeno estructuralmente normal en los lisosomas y el citoplasma de los individuos afectados. El almacenamiento excesivo de glucógeno dentro de los lisosomas puede interrumpir el funcionamiento normal de otros orgánulos y provocar lesiones celulares. La proteína defectuosa es el resultado de un empalme alternativo causado por mutaciones en el gen GAA en el brazo largo del cromosoma 17 en 17q25.2-q25.3 (par de bases 75,689,876 a 75,708,272). El gen abarca aproximadamente 20 kb y contiene 20 exones, siendo el primer exón no codificante.

Aunque se han descrito más de 460 mutaciones GAA (http://cluster15.erasmusmc.nl/klgn/pompe/mutations.html), solo se han caracterizado unas pocas mutaciones de empalme. Las mutaciones graves que anulan por completo la actividad de la enzima GAA provocan un curso de enfermedad infantil clásico con miocardiopatía hipertrófica, debilidad general del músculo esquelético e insuficiencia respiratoria y provocan la muerte dentro del año y medio de vida. Las mutaciones más leves dejan una actividad parcial de la enzima GAA y dan como resultado un fenotipo más leve con un inicio que varía desde la niñez hasta la edad adulta. En general, una mayor actividad de la enzima residual en los fibroblastos primarios se asocia con una aparición más tardía de la enfermedad de Pompe. La terapia de reemplazo enzimático (ERT) se ha desarrollado para la enfermedad de Pompe, en la que la proteína GAA humana recombinante se administra por vía intravenosa cada dos semanas. Este tratamiento puede salvar la vida de pacientes infantiles clásicos y retrasar la progresión de la enfermedad en pacientes de aparición tardía, pero los efectos son heterogéneos. La mutación IVS1, c.-32-13T>G, una mutación de transversión (T por G) que es la más común entre niños, jóvenes y adultos con este trastorno. Esta mutación interrumpe un sitio de empalme del ARN.

Los oligonucleótidos antisentido (compuestos oligoméricos antisentido) se están probando actualmente en ensayos clínicos por su capacidad para modular el empalme. Un ejemplo clásico es la distrofia muscular de Duchenne. En esta enfermedad, los puntos críticos de mutación están presentes en ciertos exones. Usando compuestos oligoméricos antisentido, se omite el exón mutado y se pasa por alto la mutación. Esto da como resultado una proteína ligeramente más corta que todavía es parcialmente funcional. Es sencillo inducir la omisión del exón usando compuestos oligoméricos antisentido, porque es evidente que el compuesto oligomérico antisentido debe dirigirse al sitio de empalme relevante. También en la epidermólisis ampollosa (documento WO2013053819) y en los síntomas de amaurosis congénita de Leber (documento WO2012168435) se utilizan oligonucleótidos antisentido para la omisión del exón.

Para la mutación IVS1 en Pompe, tal estrategia no funciona. La mutación IVS provoca una omisión del exón 2 que da como resultado la eliminación del lado de inicio de la traducción canónica y conduce a una descomposición mediada de sentido erróneo y, por lo tanto, no se transcribe ninguna proteína. Para que la terapia antisentido funcione para la mutación IVS1 en la enfermedad de Pompe, debe inducir la inclusión del exón. Sin embargo, es muy difícil inducir la inclusión del exón, porque se basa en apuntar a una secuencia represora de empalme, que no se puede predecir de forma fiable. Para la mutación IVS1, un compuesto oligomérico antisentido que bloquea una secuencia represora de empalme puede promover la inclusión del exón 2 en presencia de la mutación IVS1. Se sabe que tales secuencias represoras pueden estar presentes en cualquier parte del gen, ya sea en un exón (denominado silenciador de empalme exónico o ESS) o en un intrón (denominado silenciador de empalme intrónico o ISS) y tal vez cerca de la mutación o lejos o tal vez cerca del sitio de empalme afectado o lejos de él.

Aunque se han informado varios compuestos antisentido que son capaces de modular el empalme de un gen objetivo *in vitro*, sigue existiendo la necesidad de identificar compuestos que puedan modular el empalme del gen GAA.

Por lo tanto, un objeto de la invención es proporcionar un compuesto antisentido que sea capaz de inducir la inclusión de exones. Otro objetivo de la invención es proporcionar un compuesto antisentido que sea capaz de dirigirse a un silenciador de empalme exónico (ESS) o en un silenciador de empalme intrónico (ISS). Otro objetivo más de la

invención es proporcionar un compuesto antisentido que sea capaz de dirigirse a la mutación IVS-1. La presente invención cumple con uno o más de los objetivos.

Sumario de la invención

En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto oligomérico antisentido que se refiere a la SEQ ID NO: 1 y polimorfismo de un solo nucleótido de la SEQ ID NO: 1, en el que dicho compuesto oligomérico antisentido se:

- selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, y secuencias que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con las mismas en toda la longitud de las SEQ ID NOs: 10-17 o 33, o
- selecciona del grupo que consiste en secuencias más cortas de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, con una longitud de al menos 15 nucleótidos consecutivos, o
- selecciona del grupo que consiste en secuencias más largas que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, teniendo estas secuencias más largas una longitud máxima de 30 nucleótidos.

En un aspecto o realización de aspectos y/o realizaciones de los mismos, la invención se refiere a un compuesto oligomérico antisentido que de acuerdo con la invención es muy útil en el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, al menos uno de los nucleótidos está modificado, preferiblemente el compuesto oligomérico está modificado uniformemente.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, se modifica el azúcar de uno o más nucleótidos, preferiblemente la modificación del azúcar es 2'-O-metilo o 2'-O-metoxietilo.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, se modifica la base de uno o más nucleótidos.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, se modifica la cadena principal del compuesto oligomérico, preferiblemente los compuestos oligoméricos antisentido son fosforotioatos de morfolino o fosforodiamidato de morfolino.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, el compuesto oligomérico antisentido es la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 33.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, el compuesto oligomérico antisentido es complementario a una secuencia de ácido nucleico genómico de GAA que se refiere a la ubicación que comprende la posición de una mutación seleccionada del grupo que comprende c.-32-3C>G, c.17C>T c.469C>T c.546+23C>A, c.-32-102T>C c.-32-56C>T c.11G>A c.112G>A y c.137C>T.

En un aspecto o realización de aspectos y/o realizaciones de los mismos, la invención se refiere a un método *in vitro* para modular el empalme de pre-ARNm de GAA en una célula que comprende poner en contacto la célula con un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para restaurar la función de GAA en una célula en el que dicho método comprende la etapa de administrar un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para corregir la expresión génica anormal en una célula, preferiblemente una célula muscular, de un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con la invención.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma de la presente invención y/o realizaciones de la misma la célula o el paciente comprende al menos una mutación seleccionada del grupo c.-32-13T>G, c.-32-3C >G, c.547-6, c.1071, c.1254 y c.1552-30, preferiblemente la célula o el paciente comprende la mutación c.-32-3C>G o c.-32-13T>G.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma de la presente invención y/o realizaciones de la misma se logra la inclusión del exón, preferiblemente la inclusión del exón 2.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con la invención.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, dicha composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un agente de administración celular.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Flujo de trabajo para el análisis genérico de mutaciones en sitios de empalme. Los cambios en el uso del sitio de empalme se detectan mediante PCR utilizando cebadores que se hibridan con los exones laterales (PCR del exón lateral), seguido de secuenciación (parte izquierda). Los productos de empalme aberrantes se cuantifican mediante la hibridación de cebadores dentro de cada exón (qPCR interna del exón; parte derecha).

Figura 2: Análisis de empalme de un control sano y un paciente con Pompe que alberga la mutación común del sitio de empalme IVS1. A) Análisis de la PCR del exón lateral de un control sano. Los números del exón se indican encima de los carriles. Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa. B) Como A), pero para el paciente 1 de Pompe portador de la mutación IVS1. Los números además de las bandas se refieren a los productos analizados con más detalle (véase más abajo). C) Dibujo de las principales variantes de empalme detectadas para el paciente 1. El dibujo superior representa el ADN genómico, en el que se indica la mutación. Los dibujos inferiores se refieren a las variantes de empalme detectadas en este estudio. El sitio de inicio de la traducción se indica como c.1. Los exones se indican como recuadros. Los exones no codificantes están en marrón, los exones codificantes en verde. Los intrones se representan como líneas. Se usa una línea discontinua para indicar que el intrón es más largo que en este dibujo. Se indica un sitio de empalme alternativo. D) Análisis por qPCR interno del exón. Se usó beta-actina para la normalización. Los valores obtenidos del control sano se establecieron en 100 %. Las barras de error indican DE (n = 3).

Figura 3: Análisis de empalme de los pacientes de Pompe 3 y 4 que portan mutaciones/eliminaciones heterocigóticas. A) Análisis por PCR del exón lateral del paciente 3. B) Dibujo de las principales variantes de empalme detectadas para el paciente 3. C) Análisis por PCR del exón lateral del paciente 4. D) Dibujo de las principales variantes de empalme detectadas en el paciente 4 del alelo 1. E) Como D) pero ahora para el paciente 4, alelo 2. F) Análisis por qPCR interno del exón de los pacientes 3 y 4. Las barras de error indican DE (n = 3).

Figura 4: Análisis de empalme de pacientes de Pompe portadores de mutaciones homocigóticas. A) Análisis por PCR del exón lateral del paciente 5. B) Dibujo de la variante de empalme detectada para el paciente 5. C) Análisis por PCR del exón lateral del paciente 6. D) Dibujo de las variantes de empalme detectadas para el paciente 6. E) Análisis por PCR del exón lateral del paciente 7. F) Dibujo de la variante de empalme detectada para el paciente 7. G) Análisis por qPCR interno del exón de los pacientes 5, 6 y 7. Las barras de error indican DE (n = 3).

Figura 5: Análisis de cambios complejos de empalme en el paciente 8 de Pompe. A) Análisis por PCR del exón lateral. B) Dibujo de las variantes de empalme del alelo 1, detectadas a partir del análisis del exón 8. C) Dibujo de las variantes de empalme del alelo 1, detectadas a partir del análisis del exón 9. D) Dibujo de las variantes de empalme del alelo 2, detectadas a partir del análisis del exón 10. E) Análisis por qPCR interno del exón. Las barras de error indican DE (n = 3).

Figura 6: Tabla 1. Diagnóstico de laboratorio de los pacientes de Pompe utilizados en este estudio.

Figura 7: Tabla 2. Sumario de los eventos de empalme resultantes de las mutaciones estudiadas. Los pacientes 1-3 (en azul) se caracterizaron previamente y sirvieron para la validación del ensayo. Los pacientes 4-8 (en rojo) han sido investigados en este estudio y todos los pacientes revelaron nuevos eventos de empalme.

Figura 8: Análisis de empalme del paciente 2. A) Análisis por PCR del exón lateral. B) Análisis por PCR interno del exón.

Figura 9: Análisis de secuencia del paciente 1.

Figura 10: Análisis de secuencia del paciente 3 (A) y 4 (B-C).

Figura 11: A) Análisis por PCR del exón lateral del paciente 5 para el exón 7 utilizando un cebador directo que se hibrida con el exón 5 y un cebador inverso que se hibrida con el exón 8. A modo de comparación, se muestran las reacciones de PCR del exón lateral estándar de los exones 6 y 8. Téngase en cuenta que los niveles de ARNm de GAA en este paciente son bajos debido a la NMD. B). Análisis de secuencia del paciente 5. C) Análisis de secuencia del paciente 6. D) Análisis de secuencia del paciente 7.

Figura 12: Análisis de secuencia del paciente 8.

Figura 13: Dibujo de exones en el paciente 8 y las ubicaciones de los cebadores de PCR utilizados para el análisis por PCR de exones laterales. Solo se muestran aquellos pares de cebadores que se hibridan con los exones afectados por las mutaciones de empalme.

Figura 14: Predicciones de empalme usando cinco programas (SpliceSiteFinder-like (SSF), MaxEntScan (MES), NNSplice (NNS), GeneSplicer (GS) y Human Splicing Finder (HSF)) aplicados a secuencias mutantes y de tipo silvestre.

Figura 15: Cebadores de PCR del exón lateral usados en el Ejemplo 1.

Figura 16: Cebadores de qPCR internos del exón utilizados en el Ejemplo 1.

Figura 17: El ARNnp de U7 modificado que se usa con PCR con salientes para generar rápidamente un nuevo vector de ARNnp de U7 con secuencia antisentido.

Figura 18: El sistema lentiviral ARNnp de U7 modificado es capaz de interferir con el empalme de CyPA como se publicó anteriormente [Liu, S., et al., Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. Nucleic Acids Res, 2004. 32(12): páginas 3752-9]. Figura superior: Análisis por RT-PCR del exón 4 de la ciclofilina A (CyPA-E4). - (carril 1): células HeLa no transducidas. + (carril 2): células HeLa transducidas con lentivirus de ARNnp de U7 modificado (descritos en la Figura 17) que expresan la secuencia antisentido U7/E4 como se describe en la Figura 1B de Liu et al. Abajo: ARNm de beta actina. M: marcador de ADN de peso molecular.

Figura 19: Análisis de expresión de ARN usando RT-qPCR de un cribado realizado para secuencias en el intrón 1 y el exón 2 del pre-ARNm de GAA con secuencias antisentido usando el sistema de ARN nuclear pequeño de U7. Los números indican las posiciones de la secuencia antisentido de acuerdo con la Tabla 1.

Figura 20: Análisis de expresión de ARN usando RT-PCR de un cribado realizado para secuencias en el intrón 1 y el exón 2 del pre-ARNm de GAA con secuencias antisentido usando el sistema de ARN nuclear pequeño de U7. Los

números indican las posiciones de la secuencia antisentido de acuerdo con la Tabla 1. En la RT-PCR de GAA, se observan tres productos principales. El producto superior representa la inclusión del exón 2, el doblete inferior representa la omisión parcial del exón 2 (banda superior del doblete) y la omisión completa del exón 2 (banda inferior del doblete). Se usó RT-PCR de beta-actina como control de carga.

Figura 21: Actividad enzimática de GAA de un cribado realizada para secuencias en el intrón 1 y el exón 2 del pre-ARNm de GAA con secuencias antisentido utilizando el sistema de ARN nuclear pequeño de U7. Los números indican las posiciones de la secuencia antisentido de acuerdo con la Tabla 1.

Figura 22: Ejemplos de posiciones de secuencias antisentido que se refieren a GAA para el cribado no sesgado del intrón 1 y el exón 2.

Figura 23: El ejemplo de una predicción de empalme con el buscador de empalme humano demostró una predicción ambivalente para la secuencia -178 identificada, ya que se predijeron tanto los motivos potenciadores como los silenciadores.

Figura 24: Constructo de minigén y método para identificar secuencias que afectan el empalme de ARNm. A. Se genera un minigén y se agregan sitios de restricción únicos (en rojo); B. Se lleva a cabo una PCR degenerada con minigén como plantilla; C. Se ligan los productos de la PCR en el vector y se generan clones; D. Se los transfectan clones en células HEK293 y se analiza la RNa para la inclusión del exón 2 mediante RT-PCR lateral del exón y qPCR interna del exón; E. Análisis de secuencia del clon.

Figura 25: Ejemplos de mutaciones identificadas en el cribado del minigén IVS1. Las células HEK293 se transfectaron con constructos de minigenes y el empalme se analizó después de 24 horas. A. Análisis por RT-PCR del minigén de tipo silvestre (WT), el minigen que contiene la mutación IVS1 (IVS1) y los clones 115 y 97, que se identificaron en la selección imparcial basada en minigenes. Producto 1: ARNm de tipo silvestre, producto 2: ARNm del exón 2 parcialmente omitido, producto 3: ARNm completamente omitido. B. Dibujo de los productos de empalme. C. Análisis por RT-qPCR. Los valores se normalizaron para la eficiencia de la transfección mediante análisis por RT-qPCR de neomicina (expresada a partir de la misma columna principal del plásmido de un promotor separado) y para el número de células mediante análisis por RT-qPCR de beta-actina.

Figura 26: Corrección del empalme aberrante del exón 2 de GAA usando oligonucleótidos antisentido en el paciente 1.

Figura 27: Corrección del empalme aberrante del exón 2 de GAA usando oligonucleótidos antisentido en el paciente 2.

Figura 28: Especificidad de los compuestos oligoméricos antisentido.

Figura 32: Evolución temporal del efecto de la SEQ ID NO 33 (AON 2) en la línea 1 de fibroblastos del paciente.

Figura 33: Secuencia objetivo genómica para la inclusión del exón GAA.

Figura 34: Ensayo de empalme de una persona sana para N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa (arilsulfatasa B; ARSB).

Figura 35: Ensayo de empalme de un paciente con mucopolisacaridosis tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy) para N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa (arilsulfatasa B; ARSB).

Figura 36: Resultado de la inhibición de la vía de descomposición mediada sin sentido (NMD) al incluir el intrón 6 del ARNm de GAA.

Descripción detallada

El principio detrás de la tecnología antisentido es que un compuesto antisentido, que se hibrida con un ácido nucleico objetivo, modula las actividades de expresión génica, tales como la transcripción, el empalme o la traducción. Esta especificidad de secuencia hace que los compuestos antisentido sean extremadamente atractivos como herramientas para la validación de objetivos y la funcionalización de genes, así como también como agentes terapéuticos para modular selectivamente la expresión de genes o productos génicos implicados en enfermedades.

Aunque algunos transcritos de ARNm eucariotas se traducen directamente, muchos contienen una o más regiones, conocidas como "intrones", que se eliminan de una transcripción antes de que se traduzca. Las regiones restantes (y por lo tanto traducidas) se conocen como "exones" y se cortan y empalman para formar una secuencia continua de ARNm, lo que da como resultado uniones exón-exón en el sitio donde se unen los exones. El direccionamiento de las uniones exón-exón puede ser útil en situaciones en las que los niveles aberrantes de un producto de empalme normal están implicados en la enfermedad, o en los que los niveles aberrantes de un producto de empalme aberrante están implicados en la enfermedad. El direccionamiento a sitios de empalme, es decir, uniones intrón-exón o uniones exón-intrón, también puede ser particularmente útil en situaciones en las que el empalme aberrante está implicado en la enfermedad, o cuando la sobreproducción de un producto de empalme particular está implicada en la enfermedad. Las uniones de fusión aberrantes debidas a reordenamientos o eliminaciones también son objetivos adecuados. Los transcritos de ARNm producidos a través del proceso de empalme de dos (o más) ARNm de diferentes fuentes de genes se conocen como "transcritos de fusión" y también son objetivos adecuados. También se sabe que los intrones pueden dirigirse de forma eficaz utilizando compuestos antisentido que se refieren, por ejemplo, a ADN o pre-ARNm. Los compuestos antisentido monocatenarios, como los compuestos de oligonucleótidos que funcionan a través de un mecanismo de RNasa H, son eficaces para dirigirse al pre-ARNm. Los compuestos antisentido que funcionan a través de un mecanismo basado en la ocupación son efectivos para redirigir el empalme ya que, por ejemplo, no provocan la escisión por la RNasa H del ARNm, sino que dejan el ARNm intacto y promueven el rendimiento del producto o productos de empalme deseados.

También se sabe en la técnica que se pueden producir transcritos de ARN alternativos a partir de la misma región genómica de ADN. Estos transcritos alternativos se conocen generalmente como "variantes". Más específicamente, las "variantes de pre-ARNm" son transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico que difieren de otros transcritos producidos a partir del mismo ADN genómico en su posición de inicio o terminación y contienen secuencias tanto intrónicas como exónicas. Tras la escisión de una o más regiones de intrones o exones, o partes de las mismas durante el empalme, las variantes de pre-ARNm producen "variantes de ARNm" más pequeñas. En consecuencia, las variantes de ARNm son variantes de pre-ARNm procesadas y cada variante de pre-ARNm única siempre debe producir una variante de ARNm única como resultado del empalme. Estas variantes de ARNm también se conocen como "variantes de empalme alternativas". Si no se produce empalme de la variante de pre-ARNm, entonces la variante de pre-ARNm es idéntica a la variante de ARNm.

También se sabe en la técnica que se pueden producir variantes mediante el uso de señales alternativas para iniciar o detener la transcripción y que los pre-ARNm y los ARNm pueden poseer más de un codón de inicio o de terminación. Las variantes que se originan a partir de un pre-ARNm o ARNm que usa codones de inicio alternativos se conocen como "variantes alternativas de inicio" de ese pre-ARNm o ARNm. Aquellos transcritos que usan un codón de terminación alternativo se conocen como "variantes alternativas de terminación" de ese pre-ARNm o ARNm. Un tipo específico de variante alternativa de terminación es la "variante poliA" en la que los múltiples transcritos producidos resultan de la selección alternativa de una de las "señales de terminación de poliA" por la maquinaria de transcripción, produciendo así transcritos que terminan en sitios de poliA únicos.

Como se usa en el presente documento, "mecanismos antisentido" son todos aquellos que implican la hibridación de un compuesto con el ácido nucleico objetivo, en los que el resultado o efecto de la hibridación es la degradación del objetivo o la ocupación del objetivo con el estancamiento concomitante de la maquinaria celular que implica, por ejemplo, la transcripción o empalme.

Como se usa en el presente documento, "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para indicar que se incluyen los elementos que siguen a la palabra, pero no se excluyen los elementos que no se mencionan específicamente. Además, el verbo "consistir" puede reemplazarse por "consistir esencialmente en", lo que significa que un compuesto o compuesto adjunto como se define en el presente documento puede comprender un componente o componentes adicionales además de los identificados específicamente, dichos componente o componentes adicionales no alteran la característica única de la invención.

Los artículos "un" y "uno, una" se utilizan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos a uno) del objeto gramatical del artículo.

Los términos "individuo", "paciente" y "sujeto" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a mamíferos, en particular primates y preferiblemente humanos.

El término "exón" se refiere a una porción de un gen que está presente en la forma madura de ARNm. Los exones incluyen el ORF (marco de lectura abierto), es decir, la secuencia que codifica la proteína, así como las UTR 5' y 3' (regiones no traducidas). Las UTR son importantes para la traducción de la proteína. Hay algoritmos y programas informáticos disponibles para predecir exones en secuencias de ADN (Grail, Grail 2 y GeneScan y el documento US 20040219522 para determinar uniones exón-intrón).

Como se usa en el presente documento, el término "exón codificante de proteína" se refiere a un exón que codifica (o al menos codifica parcialmente) una proteína (o parte de una proteína). El primer exón que codifica la proteína en un ARNm es el exón que contiene el codón de inicio. El último exón que codifica la proteína en un ARNm es el exón que contiene el codón de terminación. Los codones de inicio y terminación se pueden predecir utilizando cualquier cantidad de programas bien conocidos en la técnica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "exón interno" se refiere a un exón que está flanqueado en su extremo 5' y 3' por otro exón. Para un ARNm que comprende n exones, del exón 2 al exón (n-1) son los exones internos. Los exones primero y último de un ARNm se denominan en este documento "exones externos".

El término "intrón" se refiere a una porción de un gen que no se traduce en proteína y, aunque está presente en el ADN genómico y el pre-ARNm, se elimina en la formación de ARNm maduro.

El término "ARN mensajero" o "ARNm" se refiere al ARN que se transcribe a partir del ADN genómico y que porta la secuencia codificante para la síntesis de proteínas. El pre-ARNm (ARNm precursor) se transcribe a partir del ADN genómico. En eucariotas, el pre-ARNm se procesa en ARNm, lo que incluye la eliminación de los intrones, es decir, el "empalme" y las modificaciones en los extremos 5' y 3' (por ejemplo, poliadenilación). El ARNm típicamente comprende de 5' a 3'; una protección de 5' (nucleótido de guanina modificado), UTR (región no traducida) 5', la secuencia de codificación (que comienza con un codón de inicio y termina con un codón de terminación), la UTR 3' y la cola poli(A).

El término "secuencia de ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" o polinucleótido se usan indistintamente y se refieren a una molécula de ADN o ARN en forma de cadena simple o doble. Una "secuencia de ácido nucleico aislada" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que ya no se encuentra en el entorno natural del que se aisló, por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico en una célula.

Una "mutación" en una molécula de ácido nucleico es un cambio de uno o más nucleótidos en comparación con la secuencia de tipo silvestre, por ejemplo, por reemplazo, eliminación o inserción de uno o más nucleótidos. Una "mutación puntual" es el reemplazo de un solo nucleótido, o la inserción o eliminación de un solo nucleótido.

La "identidad de secuencia" y la "similitud de secuencia" se pueden determinar mediante la alineación de dos secuencias peptídicas o de dos nucleótidos usando algoritmos de alineación globales o locales. Las secuencias pueden denominarse "sustancialmente idénticas" o "esencialmente similares" cuando están alineadas de manera óptima, por ejemplo, por los programas GAP o BESTFIT o el programa Emboss "Needle" (usando parámetros predeterminados, véase más abajo) comparten al menos un cierto mínimo porcentaje de identidad de secuencia (como se define más adelante). Estos programas utilizan el algoritmo de alineación global de Needleman y Wunsch para alinear dos secuencias en toda su longitud, maximizando el número de coincidencias y minimizando el número de espacios. En general, se utilizan los parámetros predeterminados, con una penalización por creación de espacios = 10 y una penalización por extensión de espacios = 0.5 (tanto para alineaciones de nucleótidos como de proteínas). Para los nucleótidos, la matriz de puntuación predeterminada utilizada es DNAFULL y para las proteínas, la matriz de puntuación predeterminada es Blosum62 (Henikoff y Henikoff, 1992, PNAS 89, 10915-10919). Las alineaciones de secuencias y las puntuaciones para el porcentaje de identidad de secuencia pueden determinarse, por ejemplo, utilizando programas informáticos, tales como EMBOSS (http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). Alternativamente, la similitud o identidad de la secuencia puede determinarse buscando en bases de datos tales como FASTA, BLAST, etc., pero los aciertos deben recuperarse y alinearse por pares para comparar la identidad de la secuencia. Dos proteínas o dos dominios de proteínas, o dos secuencias de ácidos nucleicos tienen una "identidad de secuencia sustancial" si el porcentaje de identidad de secuencia es de al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más, preferiblemente 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o más (de acuerdo con lo determinado por Emboss "needle" usando parámetros predeterminados, es decir, penalización por creación de espacios = 10, penalización por extensión de espacios = 0.5, usando la matriz de puntuación DNAFULL para ácidos nucleicos y Blosum62 para proteínas). Dichas secuencias también se denominan "variantes" en este documento, por ejemplo, otras variantes de compuestos oligoméricos antisentido. Debe entenderse que la secuencia con una identidad de secuencia sustancial no tiene necesariamente la misma longitud y puede diferir en longitud. Por ejemplo, las secuencias que tienen la misma secuencia de nucleótidos pero de las cuales una tiene nucleótidos adicionales en el lado 3' y/o 5' son 100 % idénticas.

El término "hibridación", como se usa en el presente documento, se usa generalmente para referirse a la hibridación de ácidos nucleicos en condiciones apropiadas de rigurosidad como sería fácilmente evidente para los expertos en la técnica dependiendo de la naturaleza de la secuencia de la sonda y las secuencias objetivo. Las condiciones de hibridación y lavado son bien conocidas en la técnica, y el ajuste de las condiciones dependiendo de la rigurosidad deseada variando el tiempo de incubación, la temperatura y/o la fuerza iónica de la solución se logra fácilmente. Véase, por ejemplo, Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2.ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989. La elección de las condiciones viene dictada por la longitud de las secuencias que se hibridan, en particular, la longitud de la secuencia de la sonda, el contenido relativo de G-C de los ácidos nucleicos y la cantidad de desapareamientos permitidos. Se prefieren condiciones de baja rigurosidad cuando se desea una hibridación parcial entre cadenas que tienen menores grados de complementariedad. Cuando se desea una complementariedad perfecta o casi perfecta, se prefieren condiciones de alta rigurosidad. Para condiciones típicas de alta rigurosidad, la solución de hibridación contiene S.S.C. 6X, EDTA 0.01 M, solución de Denhardt 1X y SOS al 0.5 %. La hibridación se lleva a cabo a aproximadamente 68 ºC durante aproximadamente 3 a 4 horas para fragmentos de ADN clonado y durante aproximadamente 12 a aproximadamente 16 horas para el ADN eucariota total. Para rigurosidades más bajas, la temperatura de hibridación se reduce a aproximadamente 42 °C por debajo de la temperatura de fusión (TM) del dúplex. Se sabe que la TM es función del contenido de G-C y la longitud del dúplex, así como de la fuerza iónica de la solución.

El término "alelo o alelos" significa cualquiera de una o más formas alternativas de un gen en un locus particular, todos los cuales se relacionan con un rasgo o característica en un locus específico. Un alelo está presente en cada cromosoma del par de cromosomas homólogos. Estos pueden ser alelos idénticos del gen (homocigotos) o dos alelos diferentes (heterocigotos).

"Alelo mutante" se refiere en el presente documento a un alelo que comprende una o más mutaciones en la secuencia codificante (ARNm, ADNc o secuencia genómica) en comparación con el alelo de tipo silvestre. Tal mutación o mutaciones (por ejemplo, inserción, inversión, eliminación y/o reemplazo de uno o más nucleótidos) pueden conducir a que la proteína codificada tenga una funcionalidad reducida *in vitro* y/o *in vivo* (función reducida) o funcionalidad no *in vitro* y/o *in vivo* (pérdida de función), por ejemplo debido a la proteína, por ejemplo, que está truncada o que tiene una secuencia de aminoácidos en la que se eliminan, insertan o reemplazan uno o más aminoácidos. Dichos cambios pueden conducir a que la proteína tenga una conformación diferente, se dirija a un compartimento subcelular diferente, tenga un dominio catalítico modificado, tenga una actividad de unión modificada con ácidos nucleicos o proteínas, etc., también puede conducir a un evento de empalme diferente.

Un "fragmento" del gen o secuencia de nucleótidos o compuesto oligomérico antisentido se refiere a cualquier subconjunto de la molécula, por ejemplo, un polinucleótido u oligonucleótido más corto.

Una "variante" se refiere a una molécula sustancialmente similar al compuesto oligomérico antisentido o un fragmento del mismo, tal como una variante de sustitución de nucleótidos que tiene uno o más nucleótidos sustituidos, pero que

mantiene la capacidad de hibridarse con el gen particular. Preferiblemente, la variante comprende las mutaciones identificadas por la invención. Las variantes también incluyen secuencias más largas.

Un "análogo" se refiere a una molécula no natural sustancialmente similar o que funciona en relación con la molécula completa, una variante o un fragmento de la misma.

Como se usa en el presente documento, los términos "ARNm precursor" o "pre-ARNm" se refieren a una cadena única inmadura de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que contiene una o más secuencias intermedias (intrones). El pre-ARNm se transcribe mediante una ARN polimerasa a partir de una plantilla de ADN en el núcleo celular y se compone de secuencias alternas de intrones y regiones codificantes (exones). Una vez que un pre-ARNm se ha procesado por completo mediante el empalme de los intrones y la unión de los exones, se denomina "ARN mensajero" o "ARNm", que es un ARN que se compone exclusivamente de exones. Los pre-ARNm eucariotas existen solo de forma transitoria antes de ser procesados completamente en ARNm. Cuando un pre-ARNm se ha procesado adecuadamente a una secuencia de ARNm, se exporta fuera del núcleo y finalmente se traduce en una proteína por los ribosomas en el citoplasma.

Como se usa en el presente documento, los términos "empalme" y "procesamiento" se refieren a la modificación de un pre-ARNm después de la transcripción, en la que se eliminan los intrones y se unen los exones. El empalme de pre-ARNm implica dos reacciones bioquímicas secuenciales. Ambas reacciones implican la transesterificación espliceosómica entre nucleótidos de ARN. En una primera reacción, el 2'-OH de un nucleótido de punto de ramificación específico dentro de un intrón, que se define durante el ensamblaje del espliceosoma, realiza un ataque nucleofílico en el primer nucleótido del intrón en el sitio de empalme 5' formando un lazo intermedio. En una segunda reacción, el 3'-OH del exón 5' liberado realiza un ataque nucleofílico en el último nucleótido del intrón en el sitio de empalme 3', uniendo así los exones y liberando el lazo de intrones. El empalme de pre-ARNm está regulado por secuencias silenciadoras intrónicas (ISS), secuencias silenciadoras exónicas (ESS) y secuencias de bucle de tallo terminal (TSL).

Como se usa en el presente documento, los términos "secuencias silenciadoras intrónicas (ISS)" y "secuencias silenciadoras exónicas (TSL)" se refieren a elementos de secuencia dentro de intrones y exones, respectivamente, que controlan el empalme alternativo mediante la unión de factores proteicos que actúan en trans dentro de un pre-ARNm dando como resultado un uso diferencial de los sitios de empalme. Por lo general, las secuencias intrónicas del silenciador están menos conservadas que los sitios de empalme en las uniones exón-intrón.

Tal como se usa en el presente documento, "modulación del empalme" se refiere a alterar el procesamiento de un transcrito de pre-ARNm de modo que haya un aumento o disminución de uno o más productos de empalme, o un cambio en la proporción de dos o más productos de empalme. La modulación del empalme también puede referirse a alterar el procesamiento de un transcrito de pre-ARNm de modo que una molécula de ARNm empalmada contenga una combinación diferente de exones como resultado de la omisión de exones o la inclusión de exones, una eliminación en uno o más exones o una secuencia adicional que no se encuentra normalmente en el ARNm empalmado (por ejemplo, secuencia de intrones).

Como se usa en el presente documento, "sitio de empalme" se refiere a la unión entre un exón y un intrón en una molécula de pre-ARNm (ARN no empalmado) (también conocido como "unión de empalme"). Un "sitio de empalme críptico" es un sitio de empalme que normalmente no se usa, pero puede usarse cuando el sitio de empalme habitual está bloqueado o no está disponible o cuando una mutación hace que un sitio normalmente inactivo se convierta en un sitio de empalme activo. Un "sitio de empalme aberrante" es un sitio de empalme que resulta de una mutación en el ADN nativo y el pre-ARNm.

Como se usa en el presente documento, "productos de empalme" o "productos que se empalman" son las moléculas de ARNm maduras generadas a partir del proceso de empalme de un pre-ARNm. Alternativamente, los pre-ARNm empalmados tienen al menos dos productos de empalme diferentes. Por ejemplo, un primer producto de empalme puede contener un exón adicional, o una porción de un exón, en relación con un segundo producto de empalme. Los productos de empalme de un pre-ARNm seleccionado pueden identificarse mediante una variedad de técnicas diferentes bien conocidas por los expertos en la técnica.

Como se usa en el presente documento, "sitio donante de empalme" se refiere a un sitio de empalme que se encuentra en el extremo 5' de un intrón o, alternativamente, en el extremo 3' de un exón. El sitio donante de empalme se usa indistintamente con "sitio de empalme 5'". Como se usa en el presente documento, "sitio aceptor de empalme" se refiere a un sitio de empalme que se encuentra en el extremo 3' de un intrón o, alternativamente, en el extremo 5' de un exón. El sitio aceptor de empalme se usa indistintamente con el "sitio de empalme 3'".

Como se usa en el presente documento, "direccionamiento" o "dirigido a" se refiere al proceso de diseñar un compuesto oligomérico de manera que el compuesto se hibride con una molécula de ácido nucleico seleccionada o región de una molécula de ácido nucleico. El direccionamiento de un compuesto oligomérico a una molécula de ácido nucleico objetivo particular puede ser un proceso de varias etapas. El proceso suele comenzar con la identificación de un ácido nucleico objetivo cuya expresión se va a modular. Como se usa en el presente documento, los términos "ácido nucleico objetivo" y "ácido nucleico que codifica GAA" abarcan ADN que codifica GAA, ARN (incluidos pre-ARNm y ARNm) transcrito a partir de dicho ADN, y también ADNc derivado de dicho ARN. Por ejemplo, el ácido

nucleico objetivo puede ser un gen celular (o ARNm transcrito a partir del gen) cuya expresión está asociada con un trastorno o estado de enfermedad particular, o una molécula de ácido nucleico de un agente infeccioso. Como se divulga en el presente documento, el ácido nucleico objetivo codifica GAA.

El proceso de direccionamiento normalmente también incluye la determinación de al menos una región, segmento o sitio objetivo dentro del ácido nucleico objetivo para que se produzca la interacción antisentido de modo que resulte el efecto deseado, por ejemplo, la modulación de la expresión.

Como se usa en el presente documento, "ARNm objetivo" se refiere a la molécula de ácido nucleico con la que los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento están diseñados para hibridar. En el contexto de la presente divulgación, el ARNm objetivo suele ser ARNm no empalmado o pre-ARNm. En el contexto de la presente invención, el ARNm objetivo es ARNm de GAA o pre-ARNm de GAA.

"Región" se define como una parte del ácido nucleico objetivo que tiene al menos una estructura, función o característica identificable. Las regiones objetivo pueden incluir, por ejemplo, un exón o intrón particular, o pueden incluir solo nucleótidos seleccionados dentro de un exón o intrón que se identifican como regiones objetivo apropiadas. Las regiones objetivo también pueden ser sitios represores de empalme. Dentro de las regiones de los ácidos nucleicos objetivo hay segmentos. Los "segmentos" se definen como porciones más pequeñas o subporciones de regiones dentro de un ácido nucleico objetivo. Los "sitios", tal como se utilizan en la presente invención, se definen como posiciones únicas de bases nitrogenadas dentro de un ácido nucleico objetivo. Como se usa en el presente documento, el "sitio objetivo" de un compuesto oligomérico es el nucleótido más 5' del ácido nucleico objetivo al que se une el compuesto.

La degradación objetivo puede incluir una RNasa H, que es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex ARN:ADN. Se sabe en la técnica que los compuestos antisentido monocatenarios que son "similares al ADN" provocan la escisión por la RNasa H. Los mecanismos antisentido basados en la ocupación, mediante los cuales los compuestos antisentido se hibridan pero no provocan la escisión del objetivo, incluyen la inhibición de la traducción, la modulación de empalme, modulación de la selección del sitio poli(A) y alteración de la estructura reguladora del ARN. Para la presente invención, se prefieren compuestos antisentido "similares a ARN" para uso en mecanismos antisentido basados en ocupación.

En el contexto de la presente divulgación, un compuesto oligomérico "dirigido a un sitio de empalme" se refiere a un compuesto que se hibrida con al menos una porción de una región de ácido nucleico que codifica un sitio de empalme o un compuesto que se hibrida con un intrón o exón en proximidad a un sitio de empalme, de modo que se modula el empalme del ARNm.

El término "compuesto oligomérico" se refiere a una estructura polimérica capaz de hibridar con una región de una molécula de ácido nucleico. Este término incluye oligonucleótidos, oligonucleósidos, análogos de oligonucleótidos, miméticos de oligonucleótidos y combinaciones quiméricas de estos. Los compuestos oligoméricos se preparan habitualmente de forma lineal, pero se pueden unir o bien preparar para que sean circulares. Además, las estructuras ramificadas son conocidas en la técnica. Los compuestos oligoméricos se pueden introducir en forma de horquillas monocatenarias, bicatenarias, circulares o ramificadas y pueden contener elementos estructurales tales como protuberancias o bucles internos o terminales. Los compuestos oligoméricos de doble cadena pueden tener dos cadenas hibridadas para formar compuestos de doble cadena o una sola cadena con suficiente autocomplementariedad para permitir la hibridación y la formación de un compuesto total o parcialmente bicatenario.

El término "oligonucleótido antisentido, AON o compuesto oligomérico antisentido" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de interactuar y/o hibridarse con un pre-ARNm o un ARNm que tiene una secuencia de nucleótidos complementaria, modificando así la expresión génica y/o el empalme. Los oligonucleótidos antisentido dependientes de enzimas incluyen formas que dependen de la actividad de la RNasa H para degradar el ARNm objetivo e incluyen ADN monocatenario, ARN y fosforotioato antisentido. Los oligonucleótidos antisentido de bloqueo estérico (antisentido independiente de RNasa-H) interfieren con la expresión génica u otros procesos celulares dependientes de ARNm al unirse a una secuencia objetivo de ARNm. El bloqueo estérico antisentido incluye oligonucleótidos antisentido de alquilo 2'-O, oligonucleótidos antisentido de morfolino y oligonucleótidos antisentido de triciclo-ADN. Los oligonucleótidos antisentido de bloqueo estérico son los preferidos en la presente invención.

Como se usa en el presente documento, los oligonucleótidos antisentido que son "independientes de la RNasa H" son aquellos compuestos que no provocan la escisión por la RNasa H cuando se hibridan con un ácido nucleico objetivo. Los compuestos oligoméricos independientes de la RNasa H modulan la expresión génica, tal como el empalme, mediante un mecanismo basado en la ocupación de objetivos. En la presente invención se prefieren los oligonucleótidos antisentido independientes de RNasa H.

Como se usa en el presente documento, "hibridación" significa el apareamiento de cadenas complementarias de compuestos oligoméricos. En el contexto de la presente divulgación, un compuesto oligomérico es hibridable específicamente cuando existe un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias de ácido nucleico no objetivo. Un experto en la técnica podrá determinar cuándo un compuesto oligomérico es específicamente hibridable.

Como se usa en el presente documento, "complementario" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede formar un enlace o enlaces de hidrógeno con otra molécula de ácido nucleico mediante el emparejamiento de bases tradicional de Watson-Crick u otros tipos de emparejamiento no tradicionales (por ejemplo, enlace de Hoogsteen o enlace de hidrógeno invertido de Hoogsteen) entre nucleósidos o nucleótidos complementarios. En referencia al compuesto oligomérico antisentido de la presente divulgación, la energía libre de unión para un compuesto oligomérico antisentido con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que se lleve a cabo la función relevante del compuesto oligomérico antisentido y haya un grado suficiente de complementariedad para evitar una unión no específica del compuesto oligomérico antisentido a secuencias no objetivo en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de tratamiento terapéutico *ex vivo* o *in vivo*. La determinación de las energías libres de unión para moléculas de ácido nucleico es bien conocida en la técnica (véase, por ejemplo, Turner et al., CSH Symp. Quant. Biol. 1/7: 123-133 (1987)); Frier et al., Proc. Nat. Acad Sci. EE.UU. 83: 9373-77 (1986); y Turner et al., J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-3785 (1987)). Por lo tanto, "complementario" (o "específicamente hibridable") son términos que indican un grado suficiente de complementariedad o emparejamiento preciso de modo que se produce una unión estable y específica entre un compuesto oligomérico antisentido y un pre-ARNm o un objetivo de ARNm. Se entiende en la técnica que una molécula de ácido nucleico no necesita ser 100 % complementaria a una secuencia de ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. Es decir, dos o más moléculas de ácido nucleico pueden ser menos que completamente complementarias. La complementariedad se indica mediante un porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden formar enlaces de hidrógeno con una segunda molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, si una primera molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos y una segunda molécula de ácido nucleico tiene 10 nucleótidos, entonces el emparejamiento de bases de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos entre la primera y la segunda molécula de ácido nucleico representa el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % de complementariedad, respectivamente. El porcentaje de complementariedad de un compuesto oligomérico con una región de un ácido nucleico objetivo se puede determinar de forma rutinaria utilizando programas BLAST (herramientas básicas de búsqueda de alineación local) y programas Power BLAST conocidos en la técnica (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang y Madden, Genoma Res., 1997, 7, 649-656). El porcentaje de homología, identidad de secuencia o complementariedad puede determinarse, por ejemplo, mediante el programa Gap (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.), utilizando la configuración predeterminada, que utiliza el algoritmo de Smith y Waterman (Av. Appl. Math., 1981, 2, 482-489). Moléculas de ácido nucleico "perfectamente" o "totalmente" complementarias significa aquellas en las que todos los residuos contiguos de una primera molécula de ácido nucleico formarán enlaces de hidrógeno con el mismo número de residuos contiguos en una segunda molécula de ácido nucleico, en las que las moléculas de ácido nucleico tienen ambas el mismo número de nucleótidos (es decir, tienen la misma longitud) o las dos moléculas tienen longitudes diferentes.

Como se usa en el presente documento, "uniformemente modificado" o "completamente modificado" se refiere a un compuesto oligomérico, un oligonucleótido antisentido o una región de nucleótidos en la que esencialmente cada nucleósido es un nucleósido modificado con azúcar que tiene una modificación uniforme.

Como se usa en el presente documento, un "compuesto oligomérico quimérico", "compuesto antisentido quimérico" o "compuesto oligonucleotídico antisentido quimérico" es un compuesto que contiene dos o más regiones químicamente distintas, cada una de las cuales comprende al menos una unidad monomérica (es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos). El término "compuesto antisentido quimérico" se refiere específicamente a un compuesto antisentido, que tiene al menos un enlace de azúcar, nucleobase y/o entre nucleósidos que está modificado diferencialmente en comparación con los otros azúcares, nucleótidos y enlaces entre nucleósidos dentro del mismo compuesto oligomérico. El resto de azúcares, nucleótidos y enlaces entre nucleósidos pueden modificarse o no modificarse independientemente. En general, un compuesto oligomérico quimérico tendrá nucleósidos modificados que pueden estar en posiciones aisladas o agrupados en regiones que definirán un motivo particular. Los compuestos oligoméricos quiméricos contienen típicamente al menos una región modificada para conferir mayor resistencia a la degradación por nucleasas, mayor absorción celular y/o mayor afinidad de unión por el ácido nucleico objetivo. En el contexto de la presente divulgación, un "compuesto antisentido quimérico independiente de la RNasa H" es un compuesto antisentido con al menos dos regiones químicamente distintas, pero que no es susceptible de escisión por la RNasa H cuando se hibrida con un ácido nucleico objetivo.

Como se usa en el presente documento, un "nucleósido" es una combinación de base y azúcar y los "nucleótidos" son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido.

Como se usa en el presente documento, un nucleósido con un residuo de azúcar modificado es cualquier nucleósido en el que el azúcar ribosa del nucleósido se ha sustituido con una fracción de azúcar químicamente modificada. En el contexto de la presente divulgación, las fracciones de azúcar químicamente modificados incluyen, pero no se limitan a, 2'-O-metoxietilo, 2'-fluoro, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-dimetilaminoetoxietoxi, 2'-guanidinio, 2'-O-guanidinio etilo, 2'-carbamato, 2'-aminooxi, 2'-acetamido y ácido nucleico bloqueado.

Como se usa en el presente documento, los compuestos "resistentes a la degradación por la RNasa H" son compuestos antisentido que tienen al menos una modificación química que aumenta la resistencia del compuesto a la escisión por la RNasa H. Dichas modificaciones incluyen, pero no se limitan a, nucleótidos con modificaciones de azúcar. Como se usa en el presente documento, un nucleótido con un azúcar modificado incluye, pero no se limita a, cualquier nucleótido en el que el azúcar 2'-desoxirribosa se haya sustituido con una fracción de azúcar químicamente

modificada. En el contexto de la presente invención, las fracciones de azúcar químicamente modificadas incluyen, pero no se limitan a, 2'-O-(2-metoxietilo), 2'-fluoro, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-dimetilaminoetoxietoxi, 2'-guanidinio , 2'-O-guanidinio etilo, 2'-carbamato, 2'-aminooxi, 2'-acetamido, ácido nucleico bloqueado (LNA) y ácido nucleico con puente de etileno (ENA). Los compuestos modificados resistentes a la escisión por RNasa H se describen detalladamente en el presente documento y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En el contexto de la presente divulgación, "absorción celular" se refiere al suministro e internalización de compuestos oligoméricos en las células. Los compuestos oligoméricos pueden ser internalizados, por ejemplo, por células cultivadas (*in vitro*), células recolectadas de un animal (*ex vivo*) o por tejidos después de la administración a un animal (*in vivo*).

Por "sujeto" se entiende un organismo, que es un donante o receptor de células explantadas o de las propias células. "Sujeto" también se refiere a un organismo al que se pueden administrar las moléculas de ácido nucleico de esta divulgación. En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, un sujeto es un mamífero o una célula de mamífero. En otra realización, un sujeto es un ser humano o una célula humana.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de compuesto oligomérico antisentido que es suficiente, en el sujeto (por ejemplo, humano) al que se administra, para tratar o prevenir la enfermedad, trastorno o condición indicada. El compuesto oligomérico antisentido de la presente divulgación, individualmente o en combinación o junto con otros fármacos, se puede usar para tratar enfermedades o afecciones discutidas en el presente documento. Por ejemplo, para tratar una enfermedad, trastorno o condición en particular, el compuesto oligomérico antisentido puede administrarse a un paciente o puede administrarse a otras células apropiadas evidentes para los expertos en la técnica, individualmente o en combinación con uno o más fármacos, en condiciones adecuadas para el tratamiento. En la presente invención, la enfermedad es preferiblemente la enfermedad de Pompe.

Como se usa en el presente documento, la frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que son fisiológicamente tolerables y normalmente no producen una reacción alérgica o similar, tal como molestias gástricas, mareos y similares, cuando se administran a un ser humano. Preferiblemente, como se usa en este documento, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en humanos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa que el material al que se hace referencia se elimina de su entorno nativo, por ejemplo, una célula. Por lo tanto, un material biológico aislado puede estar libre de algunos o todos los componentes celulares, es decir, componentes de las células en las que el material nativo se encuentra de forma natural (por ejemplo, componente citoplásmico o de membrana).

El término "purificado", tal como se usa en el presente documento, se refiere a material que se ha aislado en condiciones que reducen o eliminan la presencia de materiales no relacionados, es decir, contaminantes, incluidos los materiales nativos de los que se obtiene el material. Por ejemplo, un compuesto oligomérico antisentido de tc-ADN purificado está preferiblemente sustancialmente libre de componentes celulares o de cultivo, incluidos componentes de cultivo de tejidos, contaminantes y similares. Como se usa en este documento, el término "sustancialmente libre" se usa operativamente, en el contexto de las pruebas analíticas del material. Preferiblemente, el material purificado sustancialmente libre de contaminantes es al menos 50 % puro; más preferiblemente, al menos 90 % puro, y aún más preferiblemente al menos 99 % puro. La pureza puede evaluarse mediante cromatografía, electroforesis en gel, inmunoensayo, análisis de composición, ensayo biológico y otros métodos conocidos en la técnica.

En la presente descripción, cualquier intervalo de concentración, intervalo de porcentaje, intervalo de relación o intervalo de números enteros debe entenderse que incluye el valor de cualquier número entero dentro del intervalo mencionado y, cuando corresponda, fracciones del mismo (tal como una décima y una centésima de un entero), a menos que se indique lo contrario. Además, se debe entender que cualquier intervalo de números mencionado en este documento en relación con cualquier característica física, tal como subunidades de polímero, tamaño o espesor, incluye cualquier número entero dentro del intervalo mencionado, a menos que se indique lo contrario. Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" o "que consiste esencialmente en la media +/- 20 % del intervalo, valor o estructura indicados, a menos que se indique lo contrario.

Como se usa en este documento, los términos "incluyen" y "comprenden" se usan como sinónimos. Debe entenderse que los términos "un" y "uno, una" como se usan en el presente documento se refieren a "uno o más" de los componentes enumerados. El uso de la alternativa (por ejemplo, "o") debe entenderse como una, ambas o cualquier combinación de las alternativas.

El término "alrededor de" o "aproximadamente" significa dentro de un intervalo estadísticamente significativo de un valor. Tal intervalo puede estar dentro de un orden de magnitud, preferiblemente dentro del 50 %, más preferiblemente dentro del 20 %, más preferiblemente aún dentro del 10 % e incluso más preferiblemente dentro del 5 % de un valor o intervalo dado. La variación permisible abarcada por el término "alrededor de" o "aproximadamente" depende del sistema particular que se esté estudiando, y puede ser fácilmente apreciada por un experto en la materia.

En un aspecto, la invención se refiere a un compuesto oligomérico antisentido dirigido a la SEQ ID NO: 1 y polimorfismo de un solo nucleótido de la SEQ ID NO: 1 en el que dicho compuesto oligomérico antisentido es:

- seleccionado del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, y secuencias que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con las mismas en toda la longitud de las SEQ ID NOs: 10-17 o 33, o
- seleccionado del grupo que consiste en secuencias más cortas de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, con una longitud de al menos 15 nucleótidos consecutivos, o
- seleccionado del grupo que consiste en secuencias más largas que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, teniendo estas secuencias más largas una longitud máxima de 30 nucleótidos.

El trabajo previo de otros ha dado como resultado el diseño de compuestos oligoméricos antisentido que promueven la exclusión de exones en varios trastornos humanos, incluida la distrofia muscular de Duchenne (DMD). La estrategia es simple y directa y se basa en bloquear un sitio de empalme bien definido. Esto da como resultado la omisión del exón, eliminando así el exón que contiene la variante del gen patógeno. El ARNm resultante es un poco más corto y da como resultado la expresión de una proteína truncada con una actividad residual considerable, suficiente para aliviar al menos parcialmente la enfermedad. La estrategia es simple porque los sitios de empalme canónicos son conocidos para prácticamente todos los genes. El único requisito es diseñar un compuesto oligomérico antisentido que se una al sitio de empalme canónico en el pre-ARNm, lo que dará como resultado el bloqueo de ese sitio y la omisión del exón involucrado.

Una tarea mucho más difícil es el proceso inverso: promover la inclusión en lugar de la exclusión de un exón. Para promover la inclusión del exón, se puede bloquear un represor de empalme utilizando un compuesto oligomérico antisentido. Sin embargo, se desconoce dónde se encuentran los represores de empalme. Estos pueden estar presentes en intrones o en exones y se denominan silenciadores de empalme intrónicos o exónicos (ISS o ESS, respectivamente). Hay software disponible para predecir la presencia de tales silencios, pero estos son muy poco fiables. Esto se ilustra aún más con nuestra propia experiencia usando el sistema minigen que contiene el exón 1-3 de GAA, que no pudo confirmar la actividad de los motivos silenciadores de empalme predichos. La idea de promover la inclusión del exón 2 de GAA con un compuesto oligomérico antisentido para tratar la enfermedad de Pompe es completamente nueva. Se muestra en esta la solicitud de patente adjunta (PCT/NL2014/050375) que las secuencias represoras de empalme pueden identificarse mediante dos cribados: el cribado de compuestos oligoméricos antisentido ARNnp de U7 y el cribado de mutagénesis aleatoria/minigen. Una secuencia objetivo de este cribado se dirigió con éxito con un compuesto oligomérico antisentido, lo que resultó en una inclusión mejorada del exón 2 de GAA en el contexto de la variante IVS1. Esto corrigió el empalme aberrante del exón 2 causado por la variante IVS1, como se visualiza por la mayor abundancia de ARNm de GAA de tipo silvestre.

Se encontró que las secuencias que se dirigen a la SEQ ID NO: 1 son capaces de mejorar la inclusión del exón 2 de GAA. También secuencias que se dirigen a la SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, se encontró que podían mejorar la inclusión del exón 2 de GAA. Cabe señalar que el direccionamiento significa que al menos parte de la secuencia SEQ ID NO: 1 está dirigida, por ejemplo por una secuencia que hibrida con al menos una parte o por la secuencia SEQ ID NO: 1, o que se une al menos a una parte de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias que se refieren pueden ser más cortas o más largas que la secuencia objetivo.

Secuencia en el ADNc con la cual se hibrida el AON*	secuencia del AON (5' -> 3'):	SEQ ID NO:
c-32-156_-210	GCTCTGCACTCCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCCTTCTGGCCCTCTCCCCA	1
c-32-156_-200	GCTCTGCACTCCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCCTTCTGGC	37
c-32-160_-190	TGCACTCCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCT	38
c-32-160_195	TGCACTCCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCCTT	39
c-32-165_-195	TCCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCCTT	40

Adecuadamente, las secuencias dirigidas a la SEQ ID NO: 1 se hibridan con al menos una parte de la SEQ ID NO: 1. Las secuencias que hibridan pueden ser más cortas o más largas que la secuencia objetivo. Las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOs: 2-33 son oligómeros que pueden mejorar la inclusión del exón 2 de GAA.

Dos variantes de compuestos oligoméricos antisentido, uno de 21 nucleótidos (SEQ ID NO: 33) y uno de 25 nucleótidos (SEQ ID NO: 12), se probaron y se encontró que ambos mejoraban la inclusión del exón 2. Esto estuvo acompañado por una mayor actividad de la enzima GAA de al menos 2 veces. Se sabe que los pacientes con la variante IVS1 tienen

~15 % de empalme de tipo silvestre defectuoso. La mejora de 2 veces da como resultado actividades enzimáticas de ~30 %, que se sabe que están por encima del umbral de enfermedad del 20 % y, por lo tanto, se anticipa que restaurarán al menos una parte, o incluso completamente, la degradación del glucógeno lisosomal.

También se describe un compuesto oligomérico antisentido seleccionado del grupo que comprende las SEQ ID NOs: 2-33 y variantes y fragmentos que tienen al menos un 80 % de identidad con las mismas. El compuesto oligomérico antisentido también puede dirigirse al polimorfismo de un solo nucleótido de las SEQ ID NOs: 1, 37, 38, 39, 40. Cabe señalar que puede no ser necesario tener la longitud completa de las SEQ ID NOs: 2-33, también se contemplan fragmentos que tienen una secuencia más corta o más larga. Los inventores han encontrado la secuencia genómica objetivo que permite la inclusión del exón 2 de GAA y un experto en la materia es capaz de encontrar secuencias adecuadas que se dirijan a esta secuencia genómica objetivo, tales como las SEQ ID NOs: 1, 37, 38, 39, 40 y polimorfismos de un solo nucleótido de los mismos. Ejemplos de secuencias que se refieren a esta secuencia genómica objetivo, tales como las SEQ ID NOs: 1, 37, 38, 39 o 41 pueden ser las SEQ ID NOs: 2-33, pero también variantes y fragmentos que tienen al menos un 80 % de identidad con las mismas. En particular fragmentos más cortos tales como fragmentos con 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de las SEQ ID NOs: 2-33 están previstos.

También se describe un compuesto oligomérico antisentido dirigido a una secuencia seleccionada del grupo que comprende la secuencia genómica c-32-156-210.

También se describe un compuesto oligomérico antisentido que comprende secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEQ ID NOs: 2-33, 41-1583 y las secuencias que tienen al menos un 80 % de identidad con las mismas.

También se describe un compuesto oligomérico antisentido que comprende secuencias seleccionadas del grupo que comprende las SEQ ID NOs: 2-33 y 41-540.

También se describe un compuesto oligomérico antisentido complementario a una secuencia de ácido nucleico genómico del gen GAA dirigido a la ubicación que comprende la posición de la siguiente mutación c.-32-13T>G, c.-32-3C>G c.-32-102T>C, c.-32-56C>T, c.-32-46G>A, c.-32-28C>A, c.-32-28C>T, c.-32-21G>A, c.7G>A, c.11G>A, c.15_17AAA, c.17C>T, c.19_21AAA, c.26_28AAA, c.33_35AAA, c.39G>A, c.42C>T, c.90C>T, c.112G>A, c.137C>T, c.164C>T, c.348G>A, c.373C>T, c.413T>A, c.469C>T, c.476T>C, c.476T>G, c.478T>G, c.482C>T, c.510C>T, c.515T>A, c.520G>A, c.546+11C>T, c.546+14G>A, c .546+19G>A, c.546+23C>A, c.547-6, c.1071, c.1254, c.1552-30, c.1256A>T, c.1551+1G>T, c.546G> T, .17C>T, c.469C>T, c.546+23C>A, c.-32-102T>C, c.-32-56C>T, c.11G>A, c.112G>A, c.137C>T.

Se ha encontrado que las mutaciones identificadas anteriormente modulan el empalme. Direccionar la ubicación de la mutación también puede modular el empalme. Por lo tanto, se entiende que el compuesto oligomérico antisentido se refiere a la ubicación de la mutación. La nomenclatura de la mutación identifica la ubicación y la mutación. Se entiende que el compuesto oligomérico antisentido se refiere a la ubicación de la mutación, y no es necesario que la mutación esté presente en la secuencia genómica o en el pre-ARNm. La ubicación de la mutación es, por lo tanto, la ubicación del nucleótido mutado o la ubicación del nucleótido de tipo silvestre de la mutación. El compuesto oligomérico antisentido se puede dirigir a una secuencia que comprende nucleótidos secuencia arriba y nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación. Adecuadamente, el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende de 2 a 50 nucleótidos secuencia arriba y/o de 2 a 50 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende de 3 a 45 nucleótidos secuencia arriba y/o 3-45 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende 5-40 nucleótidos secuencia arriba y/o 5-40 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende de 6 a 35 nucleótidos secuencia arriba y/o de 6 a 35 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende de 7 a 33 nucleótidos secuencia arriba y/o de 7 a 33 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende de 8 a 30 nucleótidos secuencia arriba y/o de 8 a 30 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende 9-28 nucleótidos secuencia arriba y/o 9-28 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende 10-25 nucleótidos secuencia arriba y/o 10-25 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende 11-22 nucleótidos secuencia arriba y/o 11-22 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende 12-20 nucleótidos secuencia arriba y/o 12-20 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende 13-18 nucleótidos secuencia arriba y/o 13-18 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación, más adecuadamente el compuesto oligomérico antisentido se refiere a una secuencia que comprende 14-16 nucleótidos secuencia arriba, y/o 14-16 nucleótidos secuencia abajo de la ubicación de la mutación.

La nomenclatura es bien conocida por un experto en la materia y se puede encontrar en Dunnen y Antonarakis, Human Mutation 15: 7-12 (2000) y Antonarakis SE, the Nomenclature Working Group. 1998. Recommendations for a

nomenclature system for human gene mutations. Hum Mutat 11: 1-3 y en el sitio web (http://www.dmd.nl/mutnomen.html). Las posiciones genómicas también se pueden encontrar en www.pompecenter.nl.

Preferiblemente, la secuencia de ácido nucleico genómico es pre-ARNm.

Estos compuestos oligoméricos antisentido son útiles en el tratamiento de la enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II/enfermedad de Pompe.

En un aspecto, la secuencia objetivo es un silenciador de empalme intrónico o ISS. La secuencia objetivo es GCTCTGCACTCCCCTGCTGGAGCTTTTCTCGCCCTTCCTTCTGGCCCTCTCCCC A (SEQ ID NO: 1). Cabe señalar que también se incluyen polimorfismos de un solo nucleótido de origen natural. Compuestos oligoméricos antisentido dirigidos a la SEQ ID NO: 1 son muy adecuados para tratar pacientes con Pompe. Ejemplos de compuestos oligoméricos antisentido dirigidos a la SEQ ID NO: 1 son las SEQ ID NOs: 2-33 y en particular la SEQ ID NO: 12 y la SEQ ID NO 33. Sin embargo, la invención no se limita a estas dos secuencias. Un experto en la materia es capaz de diseñar compuestos oligoméricos antisentido contra la secuencia objetivo SEQ ID NO: 1, 37, 38, 39 o 40. Los compuestos oligoméricos antisentido frente a la SEQ ID NO: 1 secuenciada objetivo puede tener una longitud de 15 a 30 nucleótidos, preferiblemente de 24 a 29 nucleótidos, preferiblemente de 25 a 28 nucleótidos, preferiblemente de 26 a 27 nucleótidos.

A continuación, se presentan ejemplos de compuestos oligoméricos antisentido dirigidos a la SEQ ID NO: 1

Secuencia en el ADNc con la cual se hibrida el AON*	secuencia del AON (5' -> 3'):	SEQ ID NO:
c.-32-180_-156	TGGGGAGAGGGCCAGAAGGAAGGGC	2
c.-32-181_-157	GGGGAGAGGGCCAGAAGGAAGGGCG	3
c.-32-182_-158	GGGAGAGGGCCAGAAGGAAGGGCGA	4
c.-32-183_-159	GGAGAGGGCCAGAAGGAAGGGCGAG	5
c.-32-184_-160	GAGAGGGCCAGAAGGAAGGGCGAGA	6
c.-32-185_-161	AGAGGGCCAGAAGGAAGGGCGAGAA	7
c.-32-186_-162	GAGGGCCAGAAGGAAGGGCGAGAAA	8
c.-32-187_-163	AGGGCCAGAAGGAAGGGCGAGAAAA	9
c.-32-188_-164	GGGCCAGAAGGAAGGGCGAGAAAAG	10
c.-32-189_-165	GGCCAGAAGGAAGGGCGAGAAAAGC	11
c.-32-190_-166	GCCAGAAGGAAGGGCGAGAAAAGCT	12
c.-32-191_-167	CCAGAAGGAAGGGCGAGAAAAGCTC	13
c.-32-192_-168	CAGAAGGAAGGGCGAGAAAAGCTCC	14
c.-32-193_-169	AGAAGGAAGGGCGAGAAAAGCTCCA	15
c.-32-194_-170	GAAGGAAGGGCGAGAAAAGCTCCAG	16
c.-32-195_-171	AAGGAAGGGCGAGAAAAGCTCCAGC	17
c.-32-196_-172	AGGAAGGGCGAGAAAAGCTCCAGCA	18
c.-32-197_-173	GGAAGGGCGAGAAAAGCTCCAGCAG	19
c.-32-198_-174	GAAGGGCGAGAAAAGCTCCAGCAGG	20
c.-32-199_-175	AAGGGCGAGAAAAGCTCCAGCAGGG	21
c.-32-200_-176	AGGGCGAGAAAAGCTCCAGCAGGGG	22
c.-32-201_-177	GGGCGAGAAAAGCTCCAGCAGGGGA	23
c.-32-202_-178	GGCGAGAAAAGCTCCAGCAGGGGAG	24
c.-32-203_-179	GCGAGAAAAGCTCCAGCAGGGGAGT	25
c.-32-204_-180	CGAGAAAAGCTCCAGCAGGGGAGTG	26
c.-32-205_-181	GAGAAAAGCTCCAGCAGGGGAGTGC	27
c.-32-206_-182	AGAAAAGCTCCAGCAGGGGAGTGCA	28
c.-32-207_-183	GAAAAGCTCCAGCAGGGGAGTGCAG	29

Secuencia en el ADNc con la cual se hibrida el AON*	secuencia del AON (5' -> 3'):	SEQ ID NO:
c.-32-208_-184	AAAAGCTCCAGCAGGGGAGTGCAGA	30
c.-32-209_-185	AAAGCTCCAGCAGGGGAGTGCAGAG	31
c.-32-210_-186	AAGCTCCAGCAGGGGAGTGCAGAGC	32
c.-32-187_-167	CCAGAAGGAAGGGCGAGAAAA	33

En los ejemplos anteriores, las secuencias tienen una longitud de 25 nucleótidos, sin embargo, también se prevén variantes más largas o fragmentos más cortos. Un ejemplo es la SEQ ID NO: 33 que tiene solo 21 nucleótidos de largo y comprende los mismos nucleótidos que la SEQ ID NO: 12 pero es más corta. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma de la presente invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos antisentido se seleccionan del grupo de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33 y fragmentos y variantes de los mismos que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma de la presente invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos antisentido se seleccionan del grupo de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33 y fragmentos y variantes de los mismos que tienen al menos 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99.2 %, 99.3 %, 99.4 %, 99.5 %, 99.6 %, 99.7 % de identidad de secuencia con las SEQ ID NOs: 10-17 y 33.

La presente invención también está dirigida a secuencias que son al menos un 90 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 91 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 92 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 93 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 94 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 95 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 96 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 97 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 98 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, más preferiblemente al menos 99 % idénticas a las SEQ ID NOs: 10-17 y 33.

Las secuencias antisentido preferidas son la SEQ ID NO: 12, y la SEQ ID NO: 33 o secuencias que son al menos 90 % idénticas, más preferiblemente al menos 91 % idénticas, más preferiblemente al menos 92 % idénticas, más preferiblemente al menos 93 % idénticas, más preferiblemente al menos 94 % idénticas, más preferiblemente al menos 95 % idénticas, más preferiblemente al menos 96 % idénticas, más preferiblemente al menos 97 % idénticas, más preferiblemente al menos 98 % idénticas, más preferiblemente al menos 99 % idénticas a las SEQ ID NO: 12 y/o 33.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma de la presente invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos antisentido se seleccionan del grupo de fragmentos de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, en las que el fragmento tiene una longitud de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma de la presente invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos antisentido se seleccionan del grupo de fragmentos de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, en las que el fragmento tiene una longitud de 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma de la presente invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos antisentido se seleccionan del grupo de fragmentos de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, en las que el fragmento tiene una longitud de 19, 20 o 21 nucleótidos.

También se describen compuestos oligoméricos antisentido seleccionados del grupo de las SEQ ID NO: 41-540:

Secuencias identificadas con cribado de U7: SEQ ID NOs: 41-97

Secuencia en ADNc de GAA con la que se hibrida AON	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.-32-319_-300	CCAAACAGCTGTCGCCTGGG	41
c.-32-299_-280	AGGTAGACACTTGAAACAGG	42
c.-32-279_-260	CCCAGGAAGACCAGCAAGGC	43
c.-32-259_-240	TCAAACACGCTTAGAATGTC	44
c.-32-239_-220	GTCTGCTAAAATGTTACAAA	45
c.-32-219_-200	GAGTGCAGAGCACTTGCACA	46
c.-32-199_-180	CGAGAAAAGCTCCAGCAGGG	47
c.-32-179_-160	GAGAGGGCCAGAAGGAAGGG	48
c.-32-159_-140	GCCCTGCTGTCTAGACTGGG	49
c.-32-139_-120	AGGTGGCCAGGGTGGGTGTT	50
c.-32-119_-100	GCACCCAGGCAGGTGGGGTA	51

Secuencia en ADNc de GAA con la que se hibrida AON	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.-32-99_-80	CAACCGCGGCTGGCACTGCA	52
c.-32-79_-60	TCAAAGCAGCCTTGAGACAT	53
c.-32-59_-40	GGGCGGCACTCACGGGGCTC	54
c.-32-39_-20	GCTCAGCAGGGAGGCGGGAG	55
c.-32-19_-0	CCTGCGGGGAAAGAAAGCGG	56
c.-30_-12	GCCTGGACAGCTCCTACAGG	57
c.-10_+9	CACTCCCATGGTTGGAGATG	58
c.10_+29	TGGGAGCAGGGCGGGTGCCT	59
c.30_+49	CGCAGACGGCCAGGAGCCGG	60
c.50_+69	GGTTGCCAAGGACACGAGGG	61
c.70_+89	ATGTGCCCCAGGAGTGCAGC	62
c.90_+109	GCAGGAAATCATGGAGTAGG	63
c.110_+129	ACTCAGCCTCTCGGGGAACCA	64
c.130_+149	TCCAGGACTGGGGAGGAGCC	65
c.150_+169	GGTGAGCTGGGTGAGTCTCC	66
c.170_+189	TGGTCTGCTGGCTCCCTGCT	67
c.190_+209	GCCTGGGCATCCCGGGGCCC	68
c.210_+229	CTCTGGGACGGCCGGGGTGT	69
c.230_+249	GTCGCACTGTGTGGGCACTG	70
c.250_+269	AAGCGGCTGTTGGGGGGGAC	71
c.270_+289	CCTTGTCAGGGGCGCAATCG	72
c.290_+309	GCACTGTTTCCTGGGTGATGG	73
c.310_+329	TAGCAACAGCCGCGGGCCTC	74
c.330_+349	GCCCCTGCTTTGCAGGGATG	75
c.350_+369	CCCCATCTGGGCTCCCTGCA	76
c.370_+389	GGGAAGAAGCACCAGGGCTG	77
c.390_+409	TGTAGCTGGGGTAGCTGGGT	78
c.410_+429	GGAGCTCAGGTTCTCCAGCT	79
c.430_+449	GCCGTGTAGCCCATTTCAGA	80
c.450_+469	GGGTGGTACGGGTCAGGGTG	81
c.470_+489	GTCCTTGGGGAAGAAGGTGG	82
c.490_+509	TCCAGCCGCAGGGTCAGGAT	83
c.510_+529	TCTCAGTCTCCATCATCACG	84
c.530_+546	GTGAAGTGGAGGCGGT	85
c.-32-225_-206	AGAGCACTTGCACAGTCTGC	86
c.-32-223_-204	GCAGAGCACTTGCACAGTCT	87
c.-32-221_-202	GTGCAGAGCACTTGCACAGT	88
c.-32-217_-198	GGGAGTGCAGAGCACTTGCA	89
c.-32-215_-196	AGGGAGTGCAGAGCACTTG	90
c.-32-213_-194	GCAGGGGAGTGCAGAGCACT	91

Secuencia en ADNc de GAA con la que se hibrida AON	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.-32-185_-166	GCCAGAAGGAAGGGCGAGAA	92
c.-32-183_-164	GGGCCAGAAGGAAGGGCGAG	93
c.-32-181_-162	GAGGGCCAGAAGGAAGGGCG	94
c.-32-177_-158	GGGAGAGGGCCAGAAGGAAG	95
c.-32-175_-156	TGGGGAGAGGGCCAGAAGGA	96
c.-32-173_-154	ACTGGGGGAGAGGGCCAGAAG	97

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
c.-32-102C>T	CACCCAGGCAGGTGGGGTAAGGTGG	98
	AGCACCCAGGCAGGTGGGGTAAGGT	99
	GCAGCACCCAGGCAGGTGGGGTAG	100
	CTGCAGCACCCAGGCAGGTGGGGTA	101
	CACTGCACCACCCAGGCAGGTGGGG	102
	GGCACTGCACCACCCAGGCAGGTGG	103
	CTGGCACTGCACCACCCAGGCAGGT	104
	GGCTGGCACTGCAGCACCCAGGCAG	105
	GCGGCTGGCACTGCAGCACCCAGGC	106
	CCGCGGCTGGCACTGCAGCACCCAG	107
	TCAACCGCGGCTGGCACTGCAGCAC	108
	ACCCAGGCAGGTGGGGTAAGGTGGC	109
	GCACCCAGGCAGGTGGGGTAAGGTG	110
	CAGCACCCAGGCAGGTGGGGTAAGG	111
	TGCAGCACCCAGGCAGGTGGGGTAA	112
	ACTGCAGCACCCAGGCAGGTGGGGT	113
	GCACTGCACCACCCAGGCAGGTGGG	114
	TGGCACTGCACACCCAGGCAGGTG	115
	GCTGGCACTGCACCACCCAGGCAGG	116
	CGGCTGGCACTGCACCACCCAGGCA	117
	CGCGGCTGGCACTGCAGCACCCAGG	118
	ACCGCGGCTGGCACTGCAGCACCCA	119
	CAACCGCGGCTGGCACTGCAGCACC	120
	ATCAACCGCGGCTGGCACTGCAGCA	121
c.-32-56C>T, c-32-46G>A, c.-32-28C>A, c.-32-28C>T, c.-32-21G>A	GGCTCTCAAAGCAGCCTTGAGACAT	122
	GGGGCTCTCAAAGCAGCTCTGAGAC	123
	ACGGGGGCTCTCAAAGCAGCTCTGAG	124
	TCACGGGGCTCTCAAAGCAGCTCTG	125
	ACTCACGGGGCTCTCAAAGCAGCTC	126
	GCACTCACGGGGCTCTCAAAGCAGC	127
	CGGCACTCACGGGGCTCTCAAAGCA	128

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	GGCGGCACTCACGGGGCTCTCAAAG	129
	GGGGCGGCACTCACGGGGCTCTCAA	130
	GAGGGGCGGCACTCACGGGGCTCTC	131
	GGGAGGGGCGGCACTCACGGGGCTC	132
	GCGGGAGGGGCGGCACTCACGGGGC	133
	AGGCGGGAGGGGCGGCACTCACGGG	134
	GGAGGCGGGAGGGGCGGCACTCACG	135
	AGGGAGGCGGGAGGGGCGGCACTCA	136
	GCAGGGAGGCGGGAGGGGCGGCACT	137
	CAGCAGGGAGGCGGGAGGGGCGGCA	138
	CTCAGCAGGGAGGCGGGAGGGGCGG	139
	GGCTCAGCAGGGAGGCGGGAGGGGC	140
	CGGGCTCAGCAGGGAGGCGGGAGGG	141
	AGCGGGCTCAGCAGGGAGGCGGGAG	142
	AAAGCGGGCTCAGCAGGGAGGCGGG	143
	AGAAAGCGGGCTCAGCAGGGAGGCG	144
	GAAGAAAGCGGGCTCAGCAGGGAGG	145
	GAGAAGAAAGCGGGCTCAGCAGGGA	146
	GGGAGAAGAAAGCGGGCCTCAGCAGG	147
	GCGGGAAGAAAGCGGGCTCAGCA	148
	CTGCGGGAGAAGAAAGCGGGCTCAG	149
	GCCTGCGGGGAAAGAAAGCGGGCTC	150
	AGGCCTGCGGGAGAAGAAAGCGGGC	151
	ACTCCCATGGTTGGAGATGGCCTGG	152
	TCACTCCCATGGTTGGAGATGGCCT	153
	CCTCACTCCCATGGTTGGAGATGGC	154
	TGCCTCACTCCCATGGTTGGAGATG	155
	GGTGCCTCACTCCCATGGTTGGAGA	156
	CGGGTGCCTCACTCCCATGGTTGGA	157
	GGCGGGTGCCTCACTCCCATGGTTG	158
	AGGGCGGGTGCCTCACTCCCATGGT	159
	GCAGGGCGGGTGCCTCACTCCCATG	160
	GAGCAGGGCGGGTGCCTCACTCCCA	161
	GGGAGCAGGGCGGGTGCCTCACTCC	162
	GTGGGAGCAGGGCGGGTGCCTCACT	163
	CGGTGGGAGCAGGGCGGGTGCCTCA	164
	GCCGGTGGGAGCAGGGCGGGTGCCT	165
	GAGCCGGTGGGAGCAGGGCGGGTGC	166
	AGGAGCCGGTGGGAGCAGGGCGGGT	167

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	CCAGGAGCCCGGTGGGAGCAGGGCGG	168
	GGCCAGGAGCCGGTGGGAGCAGGGC	169
	ACGGCCAGGAGCCGGTGGGAGCAGG	170
	AGACGGCCAGGAGCCGGTGGGAGCA	171
	GCAGACGGCCAGGAGCCGGTGGGAG	172
	GCGCAGACGGCCAGGAGCCGGTGGG	173
	GGGCGCAGACGGCCAGGAGCCGGTG	174
	GAGGGCGCAGACGGCCAGGAGCCGG	175
	ACGAGGGCGCAGACGGCCAGGAGCC	176
	ACACGAGGGCGCAGACGGCCAGGAG	177
	GGACACGAGGGCGCAGACGGCCAGG	178
	AAGGACACGAGGGCGCAGACGGCCA	179
	CCAAGGCACGAGGGCGCAGACGGC	180
	TGCCAAGGACACGGGCGCAGACG	181
	GCTCTCAAAGCAGCTCTGAGACATC	182
	GGGCTCTCAAAGCAGCTCTGAGACA	183
	CTCACGGGGCTCTCAAAGCAGCTCT	184
	CACTCACGGGGCTCTCAAAGCAGCT	185
	GGCACTCACGGGGCTCTCAAAGCAG	186
	GCGGCACTCACGGGGCTCTCAAAAGC	187
	GGGCGGCACTCACGGGGCTCTCCAAA	188
	AGGGCGGCACTCACGGGGCTCTCA	189
	GGAGGGGCGGCACTCACGGGGCTCT	190
	CGGGAGGGGCGGCACTCACGGGGCT	191
	GGCGGGAGGGGCGGCACTCACGGGG	192
	GAGGCGGGAGGGGCGGCACTCACGG	193
	GGGAGGCGGGAGGGGCGGCACTCAC	194
	CAGGGAGGCGGGGAGGGGCGGCACTC	195
	AGCAGGGAGGCCGGGAGGGGCGGCAC	196
	TCAGCAGGGAGGCGGGAGGGGCGGC	197
	GCTCAGCAGGGAGGCGGGAGGGGCG	198
	GGGCTCAGCAGGGAGGCGGGAGGGG	199
	GCGGGCTCAGCAGGGAGGCGGGAGG	200
	AAGCGGGCTCAGCAGGGAGGCGGGA	201
	GAAAGCGGGCTCAGCAGGGAGGCGG	202
	AAAAAAGCGGGCTCAGCAGGGAGGC	203
	AGAAGAAAGCGGGCTCAGCAGGGAG	204
	GGAGAAGAAAGCGGGCTCAGCAGGG	205
	CGGGAAGAAAGCGGGCCTCAGCAG	206

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	TGCGGGAGAAGAAAGCGGGCTCAGC	207
	CCTGCGGGAGAAGAAAGCGGGCTCA	208
	GGCCTGCGGGAGAAGAAAGCGGGCT	209
	CAGGCCTGCGGGGAGAAGAAAGCGGG	210
	CGGGGCTCTCAAAGCAGCTCTGAGA	211
	CACGGGGCTCTCAAAGCAGCTCTGA	212
c.7G>A, c.11G>A,	CTCCCATGGTTGGAGATGGCCTGGA	213
c,15_17AAA, c.17C>T, c.19_21AAA, c.26_28AAA, c.33_35AAA, c.39G>A, c.42C>T	CACTCCCATGGTTGGAGATGGCCTG	214
	CTCACTCCCATGGTTGGAGATGGCC	215
	GCCTCACTCCCATGGTTGGAGATGG	216
	GTGCCTCACTCCCATGGTTGGAGAT	217
	GGGTGCCTCACTCCCATGGTTGGAG	218
	GCGGGTGCCTCACTCCCATGGTTGG	219
	GGGCGGGTGCCTCACTCCCATGGTT	220
	CAGGGCGGGTGCCTCACTCCCATGG	221
	AGCAGGGCGGGTGCCTCACTCCCAT	222
	GGAGCAGGGCGGGTGCCTCACTCCC	223
	TGGGAGCAGGGCGGGTGCCTCACTC	224
	GGTGGGAGCAGGGCGGGTGCCTCAC	225
	CCGGTGGGGAGCAGGGCGGGTGCCTC	226
	AGCCGGTGGGAGCAGGGCGGGTGCC	227
	GGAGCCGGTGGGAGCAGGGCGGGTG	228
	CAGGAGCCGGTGGGAGCAGGGCGGG	229
	GCCAGGAGCCGGTGGGAGCAGGGCG	230
	CGGCCAGGAGCCGGTGGGAGCAGGG	231
	GACGGCCAGGAGCCGGTGGGAGCAG	232
	CAGACGGCCAGGAGCCGGTGGGAGC	233
	CGCAGACGGCCAGGAGCCGGTGGGA	234
	GGCGCAGACGGCCAGGAGCCGGTGG	235
	AGGGCGCAGACGGCCAGGAGCCGGT	236
	CGAGGGCGCAGACGGCCAGGAGCCG	237
	CACGAGGGCGCAGACGGCCAGGAGC	238
	GACACGAGGGCGCAGACGGCCAGGA	239
	AGGACACGAGGGCGCAGACGGCCAG	240
	CAAGGACACGGGCGCAGACGGCC	241
	GCCAAGGACACGAGGGCGCAGACGG	242
	TTGCCAAGGACACGAGGGCGCAGAC	243
c.90C>T, c.112G>A, c.137C>T, c.164C>T	GGATGTGCCCCAGGAGTGCAGCGGT	244
	TAGGATGTGCCCCAGGAGTGCAGCG	245

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	AGTAGGATTGTGCCCCAGGAGTGCAG	246
	GGAGTAGGATGTGCCCCAGGAGTGC	247
	ATGGAGTAGGATGTGCCCCAGGAGT	248
	TCATGGAGTAGGATGTGCCCCAGGA	249
	AATCATGGAGTAGGATGTGCCCCAG	250
	GAAATCATGGAGTAGGATGTGCCCC	251
	AGGAAATCATGGAGTAGGATGTGCC	252
	GCAGGAAATCATGGAGTAGGATGTG	253
	CAGCAGGAAATCATGGAGTAGGATG	254
	ACCAGCAGGAAATCATGGAGTAGGA	255
	GAACCAGCAGGAAATCATGGAGTAG	256
	GGGAACCAGCAGGAAATCATGGAGT	257
	CGGGGAACCAGCAGGAAATCATGGA	258
	CTCGGGGAACCAGCAGGAAATCATG	259
	CTCTCGGGGAACCAGCAGGAAATCA	260
	AGCTCTCGGGGAACCAGCAGGAAAT	261
	TCAGCTCTCGGGGAACCAGCAGGAA	262
	ACTCAGCTCTCGGGGAACCAGCAGG	263
	CCACTCAGCTCTCGGGGAACCAGCA	264
	AGCCACTCAGCTCTCGGGGAACCAG	265
	GGAGCCACTCAGCTCTCGGGGAACC	266
	GAGGAGCCACTCAGCTCTCGGGGAA	267
	GGGAGGAGCCACTCAGCTCTCGGGG	268
	TGGGGAGGAGCCACTCAGCTCTCGG	269
	ACTGGGGGAGGAGCCACTCAGCTCTC	270
	GGACTGGGGGAGGAGCCACTCAGCTC	271
	CAGGACTGGGGGAGGAGCCACTCAGC	272
	TCCAGGACTGGGGAGGAGCCACTCA	273
	CCTCCAGGACTGGGGGAGGAGCCACT	274
	CTCCTCCAGGACTGGGGAGGAGCCA	275
	GTCTCCTCCAGGACTGGGGAGGAGC	276
	GAGTCTCCTCCAGGACTGGGGAGGA	277
	GTGAGTCTCCTCCAGGACTGGGGAG	278
	GGGTGAGTCTCCTCCAGGACTGGGG	279
	CTGGGTGAGTCTCCTCCAGGACTGG	280
	AGCTGGGTGAGTCTCCTCCAGGACT	281
	TGAGCTGGGTGAGTCTCCTCCAGGA	282
	GGTGAGCTGGGTGAGTCTCCTCCAG	283
	CTGGTGAGCTGGGTGAGTCTCCTCC	284

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	TGCTGGTGAGCTGGGTGAGTCTCCT	285
	CCTGCTGGTGAGCTGGGTGAGTCTC	286
	TCCCTGCTGGTGAGCTGGGTGAGTC	287
	GCTCCCTGCTGGTGAGCTGGGTGAG	288
	TGGCTCCCTGCTGGTGAGCTGGGTG	289
	GCTGGCTCCCTGCTGGTGAGCTGGG	290
	CTTGCTGGCTCCCTGCTGGTGAGCTG	291
	GTTCTGCTGGCTCCCTGCTGGTGAGC	292
	GATGTGCCCCAGGAGTGCAGCGGTT	293
	AGGATGTGCCCCAGGAGTGCAGCGG	294
	GTAGGATGTGCCCCAGGAGTGCAGC	295
	GAGTAGGATGTGCCCCAGGAGTGCA	296
	TGGAGTAGGATGTGCCCCAGGAGTG	297
	CATGGAGTAGGATGTGCCCCAGGAG	298
	ATCATGGAGTAGGATGTGCCCCAGG	299
	AAATCATGGAGTAGGATGTGCCCCA	300
	GGAAATCATGGAGTAGGATGTGCCC	301
	CAGGAAATCATGGAGTAGGATGTGC	302
	AGCAGGAAATCATGGAGTAGGATGT	303
	CCAGCAGGAAATCATGGAGTAGGAT	304
	AACCAGCAGGAAATCATGGAGTAGG	305
	GGAACCAGCAGGAAATCATGGAGTA	306
	GGGGAACCAGCAGGAAATCATGGAG	307
	TCGGGGAACCAGCAGGAAATCATGG	308
	TCTCGGGGAACCAGCAGGAAATCAT	309
	GCTCTCGGGGAACCAGCAGGAAATC	310
	CAGCTCTCGGGGAACCAGCAGGAAA	311
	CTCAGCTCTCGGGGAACCAGCAGGA	312
	CACTCAGCTCTCGGGGAACCAGCAG	313
	GCCACTCAGCTCTCGGGGAACCAGC	314
	GAGCCACTCAGCTCTCGGGGAACCA	315
	AGGAGCCACTCAGCTCTCGGGGAAC	316
	GGAGGAGCCACTCAGCTCTCGGGGA	317
	GGGGAGGAGCCACTCAGCTCTCGGG	318
	CTGGGGGAGGAGCCACTCAGCTCTCG	319
	GACTGGGGGAGGAGCCACTCAGCTCT	320
	AGGACTGGGGGAGGAGCCACTCAGCT	321
	CCAGGACTGGGGAGGAGCCACTCAG	322
	CTCCAGGACTGGGGAGGAGCCACTC	323

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	TCCTCCAGGACTGGGGGAGGAGCCAC	324
	TCTCCTCCAGGACTGGGGAGGAGCC	325
	AGTCTCCTCCAGGACTGGGGAGGAG	326
	TGAGTCTCCTCCAGGACTGGGGAGG	327
	GGTGAGTCTCCTCCAGGACTGGGGA	328
	TGGGTGAGTCTCCTCCAGGACTGGG	329
	GCTGGGTGAGTCTCCTCCAGGACTG	330
	GAGCTGGGTGAGTCTCCTCCAGGAC	331
	GTGAGCTGGGGTGAGTCTCCTCCAGG	332
	TGGTGAGCTGGGTGAGTCTCCTCCA	333
	GCTGGTGAGCTGGGTGAGTCTCCTC	334
	CTTGCTGGTGAGCTGGGTGAGTCTCC	335
	CCCTGCTGGTGAGCTGGGTGAGTCT	336
	CTCCCTGCTGGTGAGCTGGGTGAGT	337
	GGCTCCCTGCTGGTGAGCTGGGTGA	338
	CTGGTCCCTGCTGGTGAGCTGGGT	339
	TGCTGGCTCCCTGCTGGTGAGCTGG	340
	TCTGCTGGCTCCCTGCTGGTGAGCT	341
	GGTCTGCTGGCTCCCTGCTGGTGAG	342
c.348G>A, c.373C>T	AGCCCCTGCTTTGCAGGGATGTAGC	343
	GCAGCCCCTGCTTTGCAGGGATGTA	344
	CTGCAGCCCCTGCTTTGCAGGGATG	345
	CCCTGCAGCCCCTGCTTTGCAGGGA	346
	CTCCCTGCAGCCCCTGCTTTGCAGG	347
	GGCTCCCTGCAGCCCCTGCTTTGCA	348
	TGGGCTCCCTGCAGCCCCTGCTTTG	349
	TCTGGGCTCCCTGCAGCCCCTGCTT	350
	CATCTGGGCTCCCTGCAGCCCCTGC	351
	CCCATCTGGGCTCCCCTGCAGCCCCT	352
	GCCCCATCTGGGCTCCCTGCAGCCC	353
	CTGCCCCATCTGGGCTCCCTGCAGC	354
	GGCTGCCCCATCTGGGCTCCCTGCA	355
	AGGGCTGCCCCATCTGGGCTCCCTG	356
	CCAGGGCTGCCCCATCTGGGCTCCC	357
	CACCAGGGCTGCCCCATCTGGGCTC	358
	AGCACCAGGGCTGCCCCATCTGGGC	359
	GAAGCACCAGGGCTGCCCCATCTGG	360
	AAGAAGCACCAGGGCTGCCCCATCT	361
	GGAAGAAGCACCAGGGCTGCCCCAT	362

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	TGGGAAGAAGCACCAGGGCTGCCCC	363
	GGTGGGAAGAAGCACCAGGGCTGCC	364
	TGGGTGGGAAGAAGCACCAGGGCTG	365
	GCTGGGTGGGAAGAAGCACCAGGGC	366
	GCCCCTGCTTTGCAGGGATGTAGCA	367
	CAGCCCCTGCTTTGCAGGGATGTAG	368
	TGCAGCCCCTGCTTTGCAGGGATGT	369
	CCTGCAGCCCCTGCTTTGCAGGGAT	370
	TCCCTGCAGCCCCTGCTTTGCAGGG	371
	GCTCCCTGCAGCCCCTGCTTTGCAG	372
	GGGCTCCCTGCAGCCCCTGCTTTGC	373
	CTGGGCTCCCTGCAGCCCCTGCTTT	374
	ATCTGGGCTCCCTGCAGCCCCTGCT	375
	CCATCTGGGCTCCCTGCAGCCCCTG	376
	CCCCATCTGGGCTCCCTGCAGCCCC	377
	TGCCCCATCTGGGCTCCCTGCAGCC	378
	GCTGCCCCATCTGGGCTCCCTGCAG	379
	GGGCTGCCCCATCTGGGCTCCCTGC	380
	CAGGGCTGCCCCATCTGGGCTCCCT	381
	ACCAGGGCTGCCCCATCTGGGCTCC	382
	GCACCAGGGCTGCCCCATCTGGGCT	383
	AAGCACCAGGGCTGCCCCATCTGGG	384
	AGAAGCACCAGGGCTGCCCCATCTG	385
	GAAGAAGCACCAGGGCTGCCCCATC	386
	GGGAAGAAGCACCAGGGCTGCCCCA	387
	GTGGGAAGAAGCACCAGGGCTGCCC	388
	GGGTGGGAAGAAGCACCAGGGCTGC	389
	CTGGGTGGGAAGAAGCACCAGGGCT	390
	AGCTGGGTGGGAAGAAGCACCAGGG	391
c.413T>A	CAGCTTGTAGCTGGGGTAGCTGGGT	392
	TCCAGCTTGTAGCTGGGGTAGCTGG	393
	TCTCCAGCTTGTAGCTGGGGTAGCT	394
	GTTCTCCAGCTTGTAGCTGGGGTAG	395
	AGGTTCTCCAGCTTGTAGCTGGGGT	396
	TCAGGTTCTCCAGCTTGTAGCTGGG	397
	GCTCAGGTTCTCCAGCTTGTAGCTG	398
	GAGCTCAGGTTCTCCAGCTTGTAGC	399
	AGGAGCTCAGGTTCTCCAGCTTGTA	400
	AGAGGAGCTCAGGTTCTCCAGCTTG	401

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	TCAGAGGAGCTCAGGTTCTCCAGCT	402
	TTTCAGAGGAGCTCAGGTTCTCCAG	403
	AGCTTGTAGCTGGGGTAGCTGGGTG	404
	CCAGCTTGTAGCTGGGGTAGCTGGG	405
	CTCCAGCTTGTAGCTGGGGTAGCTG	406
	TTCTCCAGCTTGTAGCTGGGGTAGC	407
	GGTTCTCCAGCTTGTAGCTGGGGTA	408
	CAGGTTCTCCAGCTTGTAGCTGGGG	409
	CTCAGGTTCTCCAGCTTGTAGCTGG	410
	AGCTCAGGTTCTCCAGCTTGTAGCT	411
	GGAGCTCAGGTTCTCCAGCTTGTAG	412
	GAGGAGCTCAGGTTCTCCAGCTTGT	413
	CAGAGGAGCTCAGGTTCTCCAGCTT	414
	TTCAGAGGAGCTCAGGTTCTCCAGC	415
	ATTTCAGAGGAGCTCAGGTTCTCCA	416
c.469C>T, c.476T>C, c.476T>G, c.478T>G, c.482C>T	GGGGTGGTACGGGTCAGGGTGGCCG	417
	TGGGGGTGGTACGGGTCAGGGTGGC	418
	GGTGGGGGTGGTACGGGTCAGGGTG	419
	AAGGTGGGGGTGGTACGGGTCAGGG	420
	AGAAGGTGGGGGTGGTACGGGTCAG	421
	GAAGAAGGTGGGGGTGGTACGGTC	422
	GGGAAGAAGGTGGGGGTGGTACGGG	423
	TGGGAAGAAGGTGGGGGTGGTACG	424
	CTTGGGGAAGAAGGTGGGGGTGGTA	425
	TCCTTGGGGAAGAAGGTGGGGGTGG	426
	TGTCCTTGGGGAAGAAGGTGGGGGT	427
	GATGTCCTTGGGGAAGAAGGTGGGG	428
	AGGATGTCCTTGGGGAAGAAGGTGG	429
	TCAGGATGTCCTTGGGGAAGAAGGT	430
	GGTCAGGATGTCCTTGGGGAAGAAG	431
	AGGGTCAGGATGTCCTTGGGGAAGA	432
	GCAGGGTCAGGATGTCCTTGGGGAA	433
	CCGCAGGGTCAGGATGTCCCTTGGGG	434
	AGCCGCAGGGTCAGGATGTCCCTTGG	435
	GGGTGGTACGGGTCAGGGTGGCCGT	436
	GGGGGTGGTACGGGTCAGGGTGGCC	437
	GTGGGGGTGGTACGGGTCAGGGTGGG	438
	AGGTGGGGGTGGTACGGGTCAGGGT	439
	GAAGGTGGGGGTGGTACGGGTCAGG	440

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	AAGAAGGTGGGGGTGGTACGGGTCA	441
	GGAAGAAGGTGGGGGTGGTACGGGT	442
	GGGGAAGAAGGTGGGGGTGGTACGG	443
	TTGGGGAAGAAGGTGGGGGTGGTAC	444
	CCTTGGGGGAAGAAGGTGGGGGTGGT	445
	GTCCTTGGGGGAAGAAGGTGGGGGTG	446
	ATTGTCCTTGGGGAAGAAGGTGGGGG	447
	GGATGTCCTTGGGGAAGAAGGTGGG	448
	CAGGATGTCCTTGGGGAAGAAGGTG	449
	GTCAGGGATGTCCTTGGGGAAGAAGG	450
	GGGTCAGGATGTCCTTGGGGAAGAA	451
	CAGGGTCAGGATGTCCTTGGGGAAG	452
	CGCAGGGTCAGGATGTCCTTGGGGA	453
	GCCGCAGGGTCAGGATGTCCTTGGG	454
	CAGCCGCAGGGTCAGGATGTCCTTG	455
c.510C>T, c.515T>A, c.520G>A	CGTCCAGCCGCAGGGTCAGGATGTC	456
	CACGTCCAGCCGCAGGGTCAGGATG	457
	ATCACGTCCAGCCGCAGGGTCAGGA	458
	TCATCACGTCCAGCCGCAGGGTCAG	459
	CATCATCACGTCCAGCCGCAGGGTC	460
	TCCATCATCACGTCCAGCCGCAGGG	461
	TCTCCATCATCACGTCCAGCCGCAG	462
	AGTCTCCATCATCACGTCCAGCCGC	463
	TCAGTCTCCATCATCACGTCCAGCC	464
	TCTCAGTCTCCATCATCACGTCCAG	465
	GTTCTCAGTCTCCATCATCACGTCC	466
	CGGTTCTCAGTCTCCATCATCACGT	467
	GGCGGTTCTCAGTCTCCATCATCAC	468
	GAGGCGGTTCTCAGTCTCCATCATC	469
	TGGAGGCGGTTCTCAGTCTCCATCA	470
	AGTGGAGGCGGTTCTCAGTCTCCAT	471
	GAAGTGGAGGCGGTTCTCAGTCTCC	472
	GTCCAGCCGCAGGGTCAGGATGTCC	473
	ACGTCCAGCCGCAGGGTCAGGATGT	474
	TCACGTCCAGCCGCAGGGTCAGGAT	475
	CATCACGTCCAGCCGCAGGGTCAGG	476
	ATCATCACGTCCAGCCGCAGGGTCA	477
	CCATCATCACGTCCAGCCGCAGGGT	478
	CTCCATCATCACGTCCAGCCGCAGG	479

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	GTCTCCATCATCACGTCCAGCCGCA	480
	CAGTCTCCATCATCACGTCCAGCCG	481
	CTCAGTCTCCATCATCACGTCCAGC	482
	TTCTCAGTCTCCATCATCACGTCCA	483
	GGTTCTCAGTCTCCATCATCACGTC	484
	GCGGTTCTCAGTCTCCATCATCACG	485
	AGGCGGTTCTCAGTCTCCATCATCA	486
	GGAGGCGGTTCTCAGTCTCCATCAT	487
	GTGGAGGGCGGTTCTCAGTCTCCATC	488
	AAGTGGAGGCGGTTCTCAGTCTCCA	489
	TGAAGTGGAGGCGGTTCTCAGTCTC	490
c.546+11C>T, c.546+14G>A, c.546+19G>A, c.546+23C>A	TGCCCTGCCCACCGTGAAGTGGAGG	491
	CCTGCCCTGCCCACCGTGAAGTGGA	492
	CCCCTGCCCTGCCCACCGTGAAGTG	493
	CGCCCCTGCCCTGCCCACCGTGAAG	494
	CCCGCCCCTGCCCTGCCCACCGTGA	495
	GCCCTGCCCACCGTGAAGTGGAGGC	496
	CTGCCCCTGCCCACCGTGAAGTGGAG	497
	CCCTGCCCGTGCCCACCGTGAAGTGG	498
	GCCCCTGCCCTGCCCACCGTGAAGT	499
	CCGCCCCTGCCCTGCCCACCGTGAA	500
	CCCCGCCCCTGCCCTGCCCACCGTG	501
	GCCCCCGCCCCTGCCCTGCCCACCG	502
	CCGCCCCCGCCCCTGCCCTGCCCAC	503
	CGCCGCCCCCGCCCCTGCCCTGCCC	504
	GCCGCCGCCCCCGCCCCTGCCCTGC	505
	TGGCCGCCGCCCCCGCCCCTGCCCT	506
	CCTGGCCGCCGCCCCCGCCCCTGCC	507
	GCCCTGGCCGCCGCCCCCGCCCCTG	508
	CTGCCCCTGGCCGCCGCCCCCGCCCC	509
	CTCTGCCCTGGCCGCCGCCCCCGCC	510
	CCCTTCTGCCCTGGCCGCCGCCCCCG	511
	CACCCTTGCCCTGGCCGCCGCCCC	512
	CGCACCCTCTGCCCTGGCCGCCGCC	513
	CGCGCACCCTCTGCCCTGGCCGCCG	514
	CCCCCGCCCCTGCCCTGCCCACCGT	515
	CGCCCCCGCCCCTGCCCTGCCCACC	516
	GCCGCCCCCGCCCCTGCCCTGCCCA	517
	CCGCCGCCCCCGCCCCTGCCCCTGCC	518

variantes que afectan el empalme aberrante del exón 2 causado por IVS1 en el sistema de minigenes del exón 1-3 de GAA	Secuencia del AON diseñada para bloquear la región que rodea al elemento de empalme identificado (5' -> 3')	SEQ ID
	GGCCGCCGCCCCCGCCCCTGCCCTG	519
	CTGGCCGCCGCCCCCGCCCCTGCCCC	520
	CCCTGGCCGCCGCCCCCGCCCCTGC	521
	TGCCCTGGCCGCCGCCCCCGCCCCT	522
	TCTGCCCTGGCCGCCGCCCCCGCCC	523
	CCTCTGCCCTGGCCGCCCGCCCCCGC	524
	ACCCTCTGCCCTGGCCGCCGCCCCC	525
	GCACCCTCTGCCCTGGCCGCCGCCC	526
	GCGCACCCTCTGCCCTGGCCGCCGC	527
c.547-6	AGAGATGGGGGTTTATTGATGTTCC	528
	GAAGAGATGGGGGTTTATTGATGTT	529
	TAGAAGAGATGGGGGTTTATTGATG	530
	TCTAGAAGAGATGGGGGTTTATTGA	531
	GATCTAGAAGAGATGGGGGTTTATT	532
	TTGATCTAGAAGAGATGGGGGTTTA	533
	CTTTGATCTAGAAGAGATGGGGGTT	534
	ATCTTTGATCTAGAAGAGATGGGGG	535
	GGATCTTTGATCTGAAAGAGATGGG	536
	CTGGATCTTTGATCTAGAAGAGATG	537
	AGCTGGATCTTTGATCTAGAAGAGA	538
	TTAGCTGGATCTTTGATCTTAGAAGA	539
	TGTTAGCTGGATCTTTGATCTGAA	540

En los ejemplos anteriores, las secuencias tienen una longitud de 25 nucleótidos, sin embargo, también se prevén variantes más largas o fragmentos más cortos. También se describe que la secuencia objetivo proporciona la exclusión del intrón 6. Se encontró que la SEQ ID NO: 1584 proporciona la secuencia objetivo para la exclusión del intrón 6.

También se describe que la secuencia objetivo es

AACCCCAGAGCTGCTTCCCTTCCAGATGTGGTCCTGCAGCCGAGCCCTGCCCT
TAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTCTACATCTTCCTGGGCCCAG
AGCCCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTACCTGGACGTTGTGGGTAGGGCCTGCTC
CCTGGCCGCGGCCCCCGCCCCAAGGCTCCCTCCTCCCTCCCTCATGAAGTCGG
CGTTGGCCTGCAGGATACCCGTTCATGCCGCCATACTGGGGCCTGGGCTTCCA
CCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCGCTATCACCCGCCAGGTGGTGGAGA
ACATGACCAGGGCCCACTTCCCCCTGGTGAGTTGGGGTGGTGGCAGGGGAG

(SEQ ID NO: 1584). Cabe señalar que también se incluyen polimorfismos de un solo nucleótido de origen natural.

Además, las siguientes secuencias genómicas son secuencias objetivo para la exclusión del intrón 6 de GAA:

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON*	secuencia de región (5'-> 3'):	SEQ ID
c.956-25_1194+25	AACCCCAGAGCTGCTTCCCTTCCAGATGTGGTCCTGC AGCCGAGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTG GGATCCTGGATGTCTACATCTTCCTGGGCCCAGAGC CCAAGAGCGTGGTGCAGCAGTACCTGGACGTTGTGG GTAGGGCCTGCTCCCTGGCCGCGGCCCCCGCCCCAA GGCTCCCTCCTCCCTCCCTCATGAAGTCGGCGTTGG CCTGCAGGATACCCGTTCATGCCGCCATACTGGGGC CTGGGCTTCCACCTGTGCCGCTGGCGCTACTCCTCC ACCGCTATCACCCGCCAGGTGGTGGAGAACATGACC AGGGCCCACTTCCCCCTGGTGAGTTGGGGTGGTGGC AGGGGAG	1584
c.956-25_1004	AACCCCAGAGCTGCTTCCCTTCCAGATGTGGTCCTGC AGCCGAGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTG G	1585
c.1005_1075+3	GATCCTGGATGTCTACATCTTCCTGGGCCCAGAGCC CAAGAGCGTGGTGCAGCAGTACCTGGACGTTGTGGG TA	1586
c.1075+4_1076-2	GGGCCTGCTCCCTGGCCGCGGCCCCCGCCCCAAGGC TCCCTCCTCCCTCCCTCATGAAGTCGGCGTTGGCCTG C	1587
c.1076-2_1147	AGGATACCCGTTCATGCCGCCATACTGGGGCCTGGG CTTCCACCTGTGCCGCTGGCGCTACTCCTCCACCGCT A	1588
c.1148_1194+25	TCACCCGCCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCC ACTTCCCCCTGGTGAGTTGGGGTGGTGGCAGGGGAG	1589

Cabe señalar que el direccionamiento significa que al menos parte de las secuencias SEQ ID NOs: 1584-1589 está dirigida, por ejemplo por una secuencia que hibrida con al menos una parte o por las secuencias SEQ ID NOs: 1584-1589, o que se une al menos a una parte de las SEQ ID NOs: 1584-1589. Las secuencias que se dirigen pueden ser más cortas o más largas que la secuencia objetivo.

Adecuadamente, las secuencias dirigidas a las SEQ ID NOs: 1584-1589 se hibridan con al menos una parte de la las SEQ ID NOs: 1584-1589. Las secuencias que hibridan pueden ser más cortas o más largas que la secuencia objetivo. Las secuencias de nucleótidos SEQ ID NOs: 541-1583 son oligómeros que pueden potenciar la exclusión del intrón 6 de GAA.

También se describe un compuesto oligomérico antisentido seleccionado del grupo que comprende las SEQ ID NO: 541-1583 y variantes y fragmentos que tienen al menos un 80 % de identidad de los mismos. El compuesto oligomérico antisentido también puede dirigirse al polimorfismo de un solo nucleótido de las SEQ ID NOs: 1584-1589. Cabe señalar que puede no ser necesario tener la longitud completa de las SEQ ID NOs: 541-1583, también se contemplan fragmentos que tienen una secuencia más corta o más larga. Los inventores han encontrado la secuencia genómica objetivo que permite la exclusión del intrón 6 y un experto en la materia es capaz de encontrar secuencias adecuadas que dirijan esta secuencia genómica objetivo, tales como las SEQ ID NOs: 1584-1589 y polimorfismos de un solo nucleótido de las mismas. Los ejemplos de secuencias que dirigen esta secuencia genómica objetivo, tales como las SEQ ID NOs: 1584-1589 pueden ser las SEQ ID NOs: 541-1583, pero también variantes y fragmentos que tienen al

menos un 80 % de identidad con las mismas. En particular están previstos fragmentos más cortos tales como fragmentos con 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos de las SEQ ID NO: 541-1583.

También se describen compuestos oligoméricos antisentido seleccionados del grupo de las SEQ ID NOs: 541-1583:

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.956-25_-1	CTGGAAGGGAAGCAGCTCTGGGGTT	541
c.956-24_956	TCTGGAAGGGAAGCAGCTCTGGGGT	542
c.956-23_957	ATCTGGAAGGGAAGCAGCTCTGGGG	543
c.956-22_958	CATCTGGAAGGGAAGCAGCTCTGGG	544
c.956-21_959	ACATCTGGAAGGGAAGCAGCTCTGG	545
c.956-20_960	CACATCTGGAAGGGAAGCAGCTCTG	546
c.956-19_961	CCACATCTGGAAGGGAAGCAGCTCT	547
c.956-18_962	ACCACATCTGGAAGGGAAGCAGCTC	548
c.956-17_963	GACCACATCTTGGAAGGAGCAGCT	549
c.956-16_964	GGACCACATCTGGAAGGGAAGCAGC	550
c.956-15_965	AGGACCACATTCTGGAAGGAGCAG	551
c.956-14_966	CAGGACCACATCTGGAAGGAGCA	552
c.956-13_967	GCAGGACCACATCTGGAAGGGAAGC	553
c.956-12_968	TGCAGGACCACATCTGGAAGGGAAG	554
c.956-11_969	CTGCAGGACCACATCTGGAAGGGAA	555
c.956-10_970	GCTGCAGGACCACATCTGGAAGGGA	556
c.956-9_971	GGCTGCAGGACCCAATCTGGAAGGG	557
c.956-8_972	CGGCTGCAGGACCACATCTGGAAGG	558
c.956-7_973	TCGGCTGCAGGACCACATCTGGAAG	559
c.956-6_974	CTCGGCTGCAGGACCACATCTGGAA	560
c.956-5_975	GCTCGGCTGCAGGACCACATTCTGGA	561
c.956-4_976	GGCTCGGCTGCAGGACCACATCTGG	562
c.956-3_977	GGGCTCGGCTGCAGGACCACATCTG	563
c.956-2_978	AGGGCTCGGCTGCAGGACCACATCT	564
c.956-1_979	CAGGGCTCGGCTGCAGGACCACATC	565
c.956_980	GCAGGGCTCGGCTGCAGGACCACAT	566
c.957_981	GGCAGGGCTCGGCTGCAGGACCACA	567
c.958_982	GGGCAGGGCTCGGCTGCAGGACCAC	568
c.959_983	AGGGCAGGGCTCGGCTGCAGGACCA	569
c.960_984	AAGGGCAGGGCTCGGCTGCAGGACC	570
c.961_985	TAAGGGCAGGGCTCGGCTGCAGGAC	571
c.962_986	CTAAGGGCAGGGCTCGGCTGCAGGA	572
c.963_987	GCTAAGGGCAGGGCTCGGCTGCAGG	573
c.964_988	AGCTAAGGGCAGGGCTCGGCTGCAG	574
c.965_989	CAGCTAAGGGCAGGGCTCGGCTGCA	575
c.966_990	CCAGCTAAGGGCAGGGCTCGGCTGC	576
c.967_991	TCCAGCTAAGGGCAGGGCTCGGCTG	577

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.968_992	CTCCAGCTAAGGGCAGGGCTCGGCT	578
c.969_993	CCTCCAGCTAAGGGCAGGGCTCGGC	579
c.970_994	ACCTCCAGCTAAGGGCAGGGCTCGG	580
c.971_995	GACCTCCAGCTAAGGGCAGGGCTCG	581
c.972_996	CGACCTCCAGCTAAGGGCAGGGCTC	582
c.973_997	TCGACCTCCAGCTAAGGGCAGGGCT	583
c.974_998	GTCGACCTCCAGCTAAGGGCAGGGC	584
c.975_999	TGTCGACCTCCAGCTAAGGGCAGGG	585
c.976_1000	CTGTCGACCTCCAGCTAAGGGCAGG	586
c.977_1001	CCTGTCGACCTCCAGCTAAGGGCAG	587
c.978_1002	ACCTGTCGACCTCCAGCTAAGGGCA	588
c.979_1003	CACCTGTCGACCTCCAGCTAAGGGC	589
c.980_1004	CCACCTGTCGACCTCCAGCTAAGGG	590
c.981_1005	CCCACCTGTCGACCTCCAGCTAAGG	591
c.982_1006	TCCCACCTGTCGACCTCCAGCTAAG	592
c.983_1007	ATCCCACCTGTCGACCTCCAGCTAA	593
c.984_1008	GATCCCACCTGTCGACCTCCAGCTA	594
c.985_1009	GGATCCCACCTGTCGACCTCCAGCT	595
c.986_1010	AGGATCCCACCTGTCGACCTCCAGC	596
c.987_1011	CAGGATCCCACCTGTCGACCTCCAG	597
c.988_1012	CCAGGATCCCACCTGTCGACCTCCA	598
c.989_1013	TCCAGGATCCCACCTGTCGACCTCC	599
c.990_1014	ATCCAGGATCCCACCTGTCGACCTC	600
c.991_1015	CATCCAGGATCCCACCTGTCGACCT	601
c.992_1016	ACATCCAGGATCCCACCTGTCGACC	602
c.993_1017	GACATCCAGGATCCCACCTGTCGAC	603
c.994_1018	AGACATCCAGGATCCCACCTGTCGA	604
c.995_1019	TAGACATCCAGGATCCCACCTGTCG	605
c.996_1020	GTAGACATCCAGGATCCCACCTGTC	606
c.997_1021	TGTAGACATCCAGGATCCCACCTGT	607
c.998_1022	ATGTAGACATCCAGGATCCCACCTG	608
c.999_1023	GATGTAGACATCCAGGATCCCACCT	609
c.1000_1024	AGAGTTAGACATCCAGGATCCACC	610
c.1001_1025	AAGATGTACATCCAGGATCCCCAC	611
c.1002_1026	GAAGATGTAGACATCCAGGATCCCA	612
c.1003_1027	GGAAGATGTAGACATCCAGGATCCC	613
c.1004_1028	AGGAAGATTGTAGACATCCAGGATCC	614
c.1005_1029	CAGGAAGATGTAGACATCCAGGATC	615
c.1006_1030	CCAGGAAGATGTAGACATCCAGGAT	616
c.1007_1031	CCCAGGAAGATGTAGACTCCAGGA	617

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1008_1032	GCCCAGGAAGATGTAGACATCCAGG	618
c.1009_1033	GGCCCAGGAAGATGTAGACATCCAG	619
c.1010_1034	GGGCCCAGGAAGATGTAGACATCCA	620
c.1011_1035	TGGGCCCAGGAAGATGTAGCATCC	621
c.1012_1036	CTGGGCCCAGGAAGATGTAGACATC	622
c.1013_1037	TCGGGCCCAGGAAGATGTAGACAT	623
c.1014_1038	CTCTGGGCCCAGGAAGATGTAGACA	624
c.1015_1039	GCTCTGGGCCCAGGAAGATGTGAC	625
c.1016_1040	GGCTCTGGGCCCAGGAAGATGTAGA	626
c.1017_1041	GGGCTCTGGGCCCAGGAAGATGTAG	627
c.1018_1042	TGGGCTCTGGGCCCAGGAAGATGTA	628
c.1019_1043	TTGGGCTCTGGGCCCAGGAAGATGT	629
c,1020_1044	CTTGGGCTCTGGGCCCAGGAAGATG	630
c.1021_1045	TCTTGGGCTCTGGGCCCAGGAAGAT	631
c.1022_1046	CTCTTGGGCTCTGGGCCCAGGAAGA	632
c.1023_1047	GCTCTTGGGCTCTGGGCCCAGGAAG	633
c.1024_1048	CGCTCTTGGGCTCTGGGCCCAGGAA	634
c.1025_1049	ACGCTCTTGGGCTCTGGGCCCCAGGA	635
c.1026_1050	CACGCTTCTTGGGCTCTGGGCCCAGG	636
c.1027_1051	CCACGCTCTTGGGCTCTGGGCCCCAG	637
c.1028_1052	ACCACGCTCTTGGGCTCTGGGCCCA	638
c.1029_1053	CACCACGCTCTTGGGCTCTGGGCCCC	639
c.1030_1054	GCACCACGCTCTTGGGCTCTGGGCC	640
c.1031_1055	TGCACCACGCTCTTGGGCTCTGGGC	641
c.1032_1056	CTGCACCACGCTCTTGGGCTCTGGG	642
c.1033_1057	GCTGCACCACGCTCTTGGGCTCTGG	643
c.1034_1058	TGCTGCACCACGCTCTTGGGCTCTG	644
c.1035_1059	CTTGCTGCACCACGCTCTTGGGCTCT	645
c.1036_1060	ACTGCTGCACCACGCTCTTGGGCTC	646
c.1037_1061	TACTGCTGCACCACGCTCTTGGGCT	647
c.1038_1062	GTACTGCTGCACCACGCTCTTGGGC	648
c.1039_1063	GGTACTGCTGCACCACGCTCTTGGG	649
c.1040_1064	AGGTACTGCTGCACCACGCTCTTGG	650
c.1041_1065	CAGGTACTGCTGCACCACGCTCTG	651
c.1042_1066	CCAGGTACTGCTGCACCACGCTCTT	652
c.1043_1067	TCCAGGTACTGCTGCACCACGCTCT	653
c.1044_1068	GTCCAGGTACTGCTGCACCACGCTC	654
c.1045_1069	CGTCCAGGTACTGCTGCACCACGCT	655
c.1046_1070	ACGTCCAGGTACTGCTGCACCACGC	656
c.1047_1071	AACGTCCAGGTACTGCTGCACCACG	657

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1048_1072	CAACGTCCAGGTACTGCTGCACCAC	658
c.1049_1073	ACAACGTCCAGGTACTGCTGCACCA	659
c.1050_1074	CACAACGTCCAGGTACTGCTGCACC	660
c.1051_1075	CCACAACGTCCAGGTACTGCTGCAC	661
c.1052_1075+1	CCCACAACGTCCAGGTACTGCTGCA	662
c.1053_1075+2	ACCCACAACGTCCAGGTACTGCTGC	663
c.1054_1075+3	TACCCACAACGTCCAGGTACTGCTG	664
c.1055_1075+4	CTACCCACAACGTCCAGGTACTGCT	665
c.1056_1075+5	CCTACCCACAACGTCCAGGTACTGC	666
c.1057_1075+6	CCCTACCCACAACGTCCAGGTACTG	667
c.1058_1075+7	GCCCTACCCACAACGTCCAGGTACT	668
c.1059_1075+8	GGCCCTACCCACAACGTCCAGGTAC	669
c.1060_1075+9	AGGCCCTACCCACAACGTCCAGGTA	670
c.1061_1075+10	CAGGCCCTACCCACAACGTCCAGGT	671
c.1062_1075+11	GCAGGCCCTACCCACAACGTCCAGG	672
c.1063_1075+12	AGCAGGCCCTACCCACAACGTCCAG	673
c.1064_1075+13	GAGCAGGCCCTACCCACAACGTCCA	674
c.1065_1075+14	GGAGCAGGCCCTACCCACAACGTCC	675
c.1066_1075+15	GGGAGCAGGCCCTACCCACAACGTC	676
c.1067_1075+16	AGGGAGCAGGCCCTACCCACAACGT	677
c.1068_1075+17	CAGGGAGCAGGCCCTACCCACAACG	678
c.1069_1075+18	CCAGGGAGCAGGCCCTACCCACAAC	679
c.1070_1075+19	GCCAGGGAGCAGGCCCTACCCACAA	680
c.1071_1075+20	GGCCAGGGAGCAGGCCCTACCCACA	681
c.1072_1075+21	CGGCCAGGGAGCAGGCCCTACCCAC	682
c.1073_1075+22	GCGGCCAGGGAGCAGGCCCTACCCA	683
c.1074_1075+23	CGCGGCCAGGGAGCAGGCCCTACCC	684
c.1075_1075+24	CCGCGGCCAGGGAGCAGGCCCTACC	685
C.1075+1_+25	GCCGCGGCCAGGGAGCAGGCCCTAC	686
C.1075+2_+26	GGCCGCGGCCAGGGAGCAGGCCCTA	687
C.1075+3_+27	GGGCCGCGGCCAGGGAGCAGGCCCT	688
C.1075+4_+28	GGGGCCGCGGCCAGGGAGCAGGCCC	689
C.1075+5_+29	GGGGGCCGCGGCCAGGGAGCAGGCC	690
C.1075+6_+30	CGGGGCCGCGGCCAGGGAGCAGGC	691
C.1075+7_+31	GCGGGGGCCGCGGCCAGGGAGCAGG	692
C.1075+8_+32	GGCGGGGGCCGCGGCCAGGGAGCAG	693
C.1075+9_+33	GGGCGGGGGCCGCGGCCAGGGAGCA	694
C.1075+10_+34	GGGGCGGGGGCCGCGGCCAGGGAGC	695
C.1075+11_+35	TGGGGCGGGGGCCGCGGCCAGGGAG	696
C.1075+12_+36	TTGGGGGCGGGGGCCGCGGCCAGGGA	697

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
C.1075+13_+37	CTTGGGGCGGGGGCCGCGGCCAGGG	698
C.1075+14_+38	CCTTGGGGCGGGGGCCGCGGCCCAGG	699
C.1075+15_+39	GCCTTGGGGCGGGGGCCGCGGCCAG	700
C.1075+16_+40	AGCCTTGGGGCGGGGGCCGCGGCCCA	701
C.1075+17_1076-39	GAGCCTTGGGGCGGGGGCCGCGGCC	702
C.1075+18_1076-38	GGAGCCTTGGGGCGGGGGCCGCGGC	703
C.1075+19_1076-37	GGGAGCCTTGGGGCGGGGGCCGCGG	704
C.1075+20_1076-36	AGGGAGCCTTGGGGCGGGGGCCCGCG	705
C.1075+21_1076-35	GAGGGAGCCTTGGGGCGGGGGCCGC	706
C.1075+22_1076-34	GGAGGGAGCCTTGGGGCGGGGGCCG	707
C.1075+23_1076-33	AGGAGGGAGCCTTGGGGCGGGGGCC	708
C.1075+24_1076-32	GAGGAGGGAGCCTTGGGGCGGGGGC	709
C.1075+25_1076-31	GGAGGAGGGAGCCTTGGGGCGGGGG	710
C.1075+26_1076-30	GGGAGGAGGGAGCCTTGGGGCGGGG	711
C.1075+27_1076-29	AGGGAGGAGGGAGCCTTGGGGCGGG	712
C.1075+28_1076-28	GAGGGAGGAGGGAGCCTTGGGGCGG	713
C.1075+29_1076-27	GGAGGGAGGAGGGAGCCTTGGGGCG	714
C.1075+30_1076-26	GGGAGGGAGGAGGGAGCCTTGGGGC	715
C.1075+31_1076-25	AGGGGGGAGGAGGGAGCCTTGGGG	716
C.1075+32_1076-24	GAGGGAGGGAGGAGGGAGCCTTGGG	717
C.1075+33_1076-23	TGAGGGAGGGAGGAGGGGAGCCTTGG	718
C.1075+34_1076-22	ATGAGGGAGGGAGGAGGGGAGCCTTG	719
C.1075+35_1076-21	CATGAGGGAGGGAGGAGGGGGAGCCTT	720
C.1075+36_1076-20	TCATGAGGGAGGGAGGAGGGGAGCCT	721
C.1075+37_1076-19	TTCATGAGGGAGGGAGGAGGGAGCC	722
C.1075+38_1076-18	CTTCATGAGGGAGGGAGGAGGGGAGC	723
C.1075+39_1076-17	ACTTCATGAGGGAGGGAGGAGGGAG	724
C.1075+40_1076-16	GACTTCATGAGGGAGGGAGGAGGGA	725
c.1076-39_-15	CGACTTCATGAGGGAGGGAGGAGGG	726
c.1076-38_-14	CCGACTTCATGAGGGAGGGAGGAGGG	727
c,1076-37_-13	GCCGACTTCATGAGGGAGGGAGGAG	728
c.1076-36_-12	CGCCGACTTCATGAGGGAGGGAGGA	729
c.1076-35_-11	ACGCCGACTTCATGAGGGAGGGAGG	730
c.1076-34_-10	AACGCCGACTTCATGAGGGAGGGAG	731
c.1076-33_-9	CAACGCCGACTTCATGAGGGAGGGA	732
c.1076-32_-8	CCAACGCCGACTTCATGAGGGAGGG	733
c.1076-31_-7	GCCAACGCCGACTTCATGAGGGAGG	734
c.1076-30_-6	GGCCAACGCCGACTTCATGAGGGAG	735
c.1076-29_-5	AGGCCAACGCCGACTTCATGAGGGA	736
c.1076-28_-4	CAGGCCAACGCCGACTTCATGAGGG	737

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1076-27_-3	GCAGGCCAACGCCGACTTCATGAGG	738
c.1076-26_-2	TGCAGGCCAACGCCGACTTCATGAG	739
c.1076-25_-1	CTGCAGGCCAACGCCGACTTCATGA	740
c.1076-24_1076	CCTGCAGGCCAACGCCGACTTCATG	741
c.1076-23_1077	TCCTGCAGGCCAACGCCGACTTCAT	742
c,1076-22_1078	ATCCTGCAGGCCAACGCCGACTTCA	743
c.1076-21_1079	TATCCTGCAGGCCAACGCCGACTTC	744
c.1076-20_1080	GTATCCTGCAGGCCAACGCCGACTT	745
c.1076-19_1081	GGTATCCTGCAGGCCAACGCCGACT	746
c.1076-18_1082	GGGTATCCTGCAGGCCAACGCCGAC	747
c.1076-17_1083	CGGGTATCCTGCAGGCCAACGCCGA	748
C. 1076-16_1084	ACGGGTATCCTGCAGGCCAACGCCG	749
c.1076-15_1085	AACGGGTATCCTGCAGGCCAACGCC	750
c.1076-14_1086	GAACGGGTATCCTGCAGGCCAACGC	751
c.1076-13_1087	TGAACGGGTATCCTGCAGGCCAACG	752
c.1076-12_1088	ATGAACGGGTATCCTGCAGGCCAAC	753
c.1076-11_1089	CATGAACGGGTATCCTGCAGGCCAA	754
c.1076-10_1090	GCATGAACGGGTATCCTGCAGGCCA	755
c.1076-9_1091	GGCATGAACGGGTATCCTGCAGGCC	756
c.1076-8_1092	CGGCATGAACGGGTATCCTGCAGGC	757
c,1076-7_1093	GCGGCATGAACGGGTATCCTGCAGG	758
c.1076-6_1094	GGCGGCATGAACGGGTATCCTGCAG	759
c.1076-5_1095	TGGCGGCATGAACGGGTATCCTGCA	760
c.1076-4_1096	ATGGCGGCATGAACGGGTATCCCTGC	761
c.1076-3_1097	TATGGCGGCATGAACGGGTATCCTG	762
c.1076-2_1098	GTATGGCGGCATGAACGGGTATCCT	763
c.1076-1_1099	AGTATGGCGGCATGAACGGGTATCC	764
c.1076_1100	CAGTTAGGCGGCATGAACGGGTATC	765
c.1077_1101	CCAGTATGGCGGCATGAACGGGTAT	766
c.1078_1102	CCCAGTATGGCGGCATGAACGGGTA	767
c.1079_1103	CCCCAGTATGGCGGCATGAACGGGT	768
c.1080_1104	GCCCCAGTATGGCGGCATGAACGGG	769
c.1081_1105	GGCCCCAGTATGGCGGCATGAACGG	770
c.1082_1106	AGGCCCCAGTATGGCGGCATGAACG	771
c.1083_1107	CAGGCCCCAGTATGGCGGCATGAAC	772
c.1084_1108	CCAGGCCCCAGTATGGCGGCATGAA	773
c.1085_1109	CCCAGGCCCCAGTATGGCGGCATGA	774
c.1086_1110	GCCCAGGCCCCAGTATGGCGGCATG	775
c.1087_1111	AGCCCAGGCCCCAGTATGGCGGCAT	776
c.1088_1112	AAGCCCAGGCCCCAGTATGGCGGCA	777

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1089_1113	GAAGCCCAGGCCCCAGTATGGCGGC	778
c.1090_1114	GGAAGCCCAGGCCCCAGTATGGCGG	779
c.1091_1115	TGGAAGCCCAGGCCCCAGTATGCG	780
c.1092-1116	GTGGAAGCCCAGGCCCCAGTATGGC	781
c.1093_1117	GGTGGAAGCCCAGGCCCCAGTATGG	782
c.1094_1118	AGGTGGAAGCCCAGGCCCCAGTATG	783
c.1095-1119	CAGGTGGAAGCCCAGGCCCCAGTAT	784
c.1096_1120	ACAGGTGGAAGCCCAGGCCCCAGTA	785
c.1097_1121	CACAGGTGGAAGCCCAGGCCCCAGT	786
c.1098_1122	GCACAGGTGGAAGCCCAGGCCCCAG	787
c.1099_1123	GGCACAGGTGGAAGCCCAGGCCCCA	788
c.1100_1124	CGGCACAGGTGGAAGCCCAGGCCCC	789
c.1101_1125	GCGGCACAGGTGGAAGCCCAGGCCC	790
c.1102-1126	AGCGGCACAGGTGGAAGCCCAGGCC	791
c.1103_1127	CAGCGGCACAGGTGGAAGCCCAGGC	792
c.1104_1128	CCAGCGGCACAGGTGGAAGCCCAGG	793
c.1105_1129	CCCAGCGGCACAGGTGGAAGCCCCAG	794
c.1106-1130	CCCCAGCGGCACAGGTGGAAGCCCA	795
c.1107_1131	GCCCCAGCGGCACAGGTGGAAGCCC	796
c.1108_1132	AGCCCCAGCGGCACAGGTGGAAGCC	797
c.1109_1133	TAGCCCCAGCGGCACAGGTGGAAGC	798
c.1110_1134	GTAGCCCCAGCGGCACAGGTGGAAG	799
c.1111_1135	AGTAGCCCCAGCGGCACAGGTGGAA	800
c.1112_1136	GAGTAGCCCCAGCGGCACAGGTGGA	801
c.1113_1137	GGAGTAGCCCCAGCGGCACAGGTGG	802
c.1114_1138	AGGAGTAGCCCCAGCGGCACAGGTG	803
c.1115_1139	GAGGAGTAGCCCCAGCGGCACAGGT	804
c.1116_1140	GGAGGAGTAGCCCCAGCGGCACAGG	805
c.1117_1141	TGGAGGAGTAGCCCCAGCGGCACAG	806
c.1118_1142	GTGGAGGAGTAGCCCCAGCGGCACA	807
c.1119_1143	GGTGGAGGAGTAGCCCCAGCGGCAC	808
c.1120_1144	CGGTGGAGGAGTAGCCCCAGCGGCA	809
c.1121_1145	GCGGTGGAGGAGTAGCCCCAGCGGC	810
c.1122_1146	AGCGGTGGAGGAGTAGCCCCAGCGG	811
c.1123_1147	TAGCGGTGGAGGAGTAGCCCCAGCG	812
c.1124_1148	ATAGCGGTGGAGGAGTAGCCCCAGC	813
c.1125_1149	GATAGCGGTGGAGGAGTAGCCCCAG	814
c.1126_1150	TGATAGCGGTGGAGGAGTAGCCCCA	815
c.1127_1151	GTGATAGCGGTGGAGGAGTAGCCCC	816
c.1128_1152	GGTGATAGCGGTGGAGGAGTAGCCC	817

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1129_1153	GGGTGATAGCGGTGGAGGATGAGCC	818
c.1130_1154	CGGGTGATAGCGGTGGAGGAGTAGC	819
c.1131_1155	GCGGGTGATAGCGGTGGAGGAGTAG	820
c.1132_1156	GGCGGGTGATAGCGGTGGAGGAGTA	821
c.1133_1157	TGGCGGGTGATAGCGGTGGAGGAGT	822
c.1134_1158	CTGGCGGGTGATAGCGGTGGAGGAG	823
c.1135_1159	CCTGGCGGGTGATAGCGGTGGAGGA	824
c.1136_1160	ACCTGGCGGGTGATAGCGGTGGAGG	825
c.1137_1161	CACCTGGCGGGTGATAGCGGTGGAG	826
c.1138_1162	CCACCTGGCGGGTGATAGCGGTGGA	827
c.1139_1163	ACCACCTGGCGGGTGATAGCGGTGG	828
c.1140_1164	CACCACCTGGCGGGTGATAGCGGTG	829
c.1141_1165	CCACCACCTGGCGGGTGATAGCGGT	830
c.1142_1166	TCCACCACCTGGCGGGTGATAGCGG	831
c.1143_1167	CTCCACCACCTGGCGGGTGATAGCG	832
c.1144_1168	TCTCCACCACCTGGCGGGTGATAGC	833
c.1145_1169	TTCTCCACCACCTGGCGGGTGATAG	834
c.1146_1170	GTTTCCCACCACCTGGCGGGTGATA	835
c.1147_1171	TGTTCTCCACCACCTGGCGGGTGAT	836
c.1148_1172	ATGTTCTCCACCACCTGGCGGGTGA	837
c.1149_1173	CATGTTCTCCACCACCTGGCGGGTG	838
c.1150_1174	TCATGTTCTCCACCACCTGGCGGGT	839
c.1151_1175	GTCATGTTCTCCACCACCTGGCGGG	840
c.1152_1176	GGTCATGTTCTCCACCACCTGGCGG	841
c.1153_1177	TGGCATGTTCTCCACCACCTGGCG	842
c.1154_1178	CTGGTCATGTTTCTCCACCACCTGGC	843
c.1155_1179	CCTGGTCATGTTCTCCACCACCTGG	844
c.1156_1180	CCCTGGTCATGTTCTCCACCACCTG	845
c.1157_1181	GCCCTGGTCATGTTCTCCACCACCT	846
c.1158_1182	GGCCCTGGTCATGTTCTCCACCACC	847
c.1159_1183	GGGCCCTGGTCATGTTCTCCACCAC	848
c.1160_1184	TGGGCCCTGGTCATGTTCTCCACCA	849
c.1161_1185	GTGGGCCCTGGTCATGTTCTCCACC	850
c.1162_1186	AGTGGGCCCTGGTCATGTTCTCCAC	851
c.1163_1187	AAGTGGGCCCTGGTCATGTTCTCCA	852
c.1164_1188	GAAGTGGGCCCTGGTCATGTTCTCC	853
c.1165_1189	GGAAGTGGGCCCTGGTCATGTTCTC	854
c.1166_1190	GGGAAGTGGGCCCTGGTCATGTTCT	855
c.1167_1191	GGGGAAGTGGGCCCTGGTCATGTTC	856
c.1168_1192	GGGGGAAGTGGGCCCTGGTCATGTT	857

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1169_1193	AGGGGGAAGTGGGCCCTGGTCATGT	858
c.1170_1194	CAGGGGGAAGTGGGCCCTGGTCATG	859
c.1171_1194+1	CCAGGGGGGAAGTGGGCCCTGGTCAT	860
c.1172_1194+2	ACCAGGGGGAAGTGGGCCCTGGTCA	861
c.1173_1194+3	CACCAGGGGGAAGTGGGCCCTGGTC	862
c.1174_1194+4	TCACCAGGGGGAAGTGGGCCCTGGT	863
c.1175_1194+5	CTCACCAGGGGGAAGTGGGCCCTGG	864
c.1176_1194+6	ACTCACCAGGGGGAAGTGGGCCCTG	865
c.1177_1194+7	AACTCACCAGGGGGAAGTGGGCCCT	866
c.1178_1194+8	CAACTCACCAGGGGGAAGTGGGCCC	867
c.1179_1194+9	CCAACTCACCAGGGGGAAGTGGGCC	868
c.1180_1194+10	CCCAACTCACCAGGGGGAAGTGGGC	869
c.1181_1194+11	CCCCAACTCACCAGGGGGAAGTGGG	870
c.1182_1194+12	ACCCCAACTCACCAGGGGGAAGTGG	871
c.1183_1194+13	CACCCCAACTCACCAGGGGGAAGTG	872
c.1184_1194+14	CCACCCCAACTCACCAGGGGGAAGT	873
c.1185_1194+15	ACCACCCCAACTCACCAGGGGGAAG	874
c.1186_1194+16	CACCACCCCAACTCACCAGGGGGAA	875
c.1187_1194+17	CCACCACCCCAACTCACCAGGGGGGA	876
c.1188_1194+18	GCCACCACCCCAACTCACCAGGGGG	877
c.1189_1194+19	TGCCACCACCCCAACTCACCAGGGG	878
c.1190_1194+20	CTGCCACCACCCCAACTCACCAGGG	879
c.1191_1194+21	CCTGCCACCACCCCAACTCACCAGG	880
c.1192_1194+22	CCCTGCCACCACCCCAACTCACCAG	881
c.1193_1194+23	CCCCTGCCACCACCCCAACTCACCA	882
c.1194_1194+24	TCCCCTGCCACCACCCCAACTCACC	883
c.1194+1_+25	CTCCCCTGCCACCACCCCAACTCAC	884
c.956-25_-5	AAGGGAAGCAGCTCTGGGGTT	885
c.956-24_-4	GAAGGGAAGCAGCTCTGGGGT	886
c.956-23_-3	GGAAGGGAAGCAGCTCTGGGG	887
c.956-22_-2	TGGAAGGGAAGCAGCTCTGGG	888
c.956-21_-1	CTGGAAGGGAAGCAGCTCTGG	889
c.956-20_956	TCTGGAAGGGAAGCAGCTCTG	890
c.956-19_957	ATCTGGAAGGGAAGCAGCTCT	891
c.956-18_958	CATCTGGAAGGGAAGCAGCTC	892
c.956-17_959	ACATCTGGAAGGAGCAGCT	893
c.956-16_960	CACATCTGGAAGGGAAGCAGC	894
c.956-15_961	CCACATCTGGAAGGGAAGCAG	895
c.956-14_962	ACCACATCTGGAAGGGAAGCA	896
c.956-13_963	GACCACATCTGGAAGGGAAGC	897

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.956-12_964	GGACCACATCTGGAAGGGAAG	898
c.956-11_965	AGGACCACATTCTGGAAGGA	899
c.956-10_966	CAGGACCACATCTGGAAGGGA	900
c.956-9_967	GCAGGACCCAATCTGGAAGGG	901
c.956-8_968	TGCAGGACCACATCTGGAAGG	902
c.956-7_969	CTGCAGGACCACATCTGGAAG	903
c.956-6_970	GCTGCAGGACCACATCTGGAA	904
c.956-5_971	GGCTGCAGGACCACATCTTGGA	905
c.956-4_972	CGGCTGCAGGACCACATCTGG	906
c.956-3_973	TCGGCTGCAGGACCACATCTG	907
c.956-2_974	CTCGGCTGCAGGACCACATCT	908
c.956-1_975	GCTCGGCTGCAGGACCACATC	909
c.956_976	GGCTCGGCTGCAGGACCACAT	910
c.957_977	GGGCTCGGCTGCAGGACCACA	911
c.958_978	AGGGCTCGGCTGCAGGACCAC	912
c.959_979	CAGGGCTCGGCTGCAGGACCA	913
c.960_980	GCAGGGCTCGGCTGCAGGACC	914
c.961_981	GGCAGGGCTCGGCTGCAGGAC	915
c.962_982	GGGCAGGGCTCGGCTGCAGGA	916
c.963_983	AGGGCAGGGCTCGGCTGCAGG	917
c.964_984	AAGGGCAGGGCTCGGCTGCAG	918
c.965_985	TAAGGGCAGGGCTCGGCTGCA	919
c.966_986	CTAAGGGCAGGGCTCGGCTGC	920
c.967_987	GCTAAGGGCAGGGCTCGGCTG	921
c.968_988	AGCTAAGGGCAGGGCTCGGCT	922
c.969_989	CAGCTAAGGGCAGGGCTCGGC	923
c.970_990	CCAGCTAAGGGCAGGGCTCGG	924
c.971_991	TCCAGCTAAGGGCAGGGCTCG	925
c.972_992	CTCCAGCTAAGGGCAGGGCTC	926
c.973_993	CCTCCAGCTAAGGGCAGGGCT	927
c.974_994	ACCTCCAGCTAAGGGCAGGGC	928
c.975_995	GACCTCCAGCTAAGGGCAGGG	929
c.976_996	CGACCTCCAGCTAAGGGCAGG	930
c.977_997	TCGACCTCCAGCTAAGGGCAG	931
c.978_998	GTCGACCTCCAGCTAAGGGCA	932
c.979_999	TGTCGACCTCCAGCTAAGGGC	933
c.980_1000	CTGTCGACCTCCAGCTAAGGG	934
c.981_1001	CCTGTCGACCTCCAGCTAAGG	935
c.982_1002	ACCTGTCGACCTCCAGCTAAG	936
c.983_1003	CACCTGTCGACCTCCAGCTAA	937

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.984_1004	CCACCTGTCGACCTCCAGCTA	938
c.985_1005	CCCACCTGTCGACCTCCAGCT	939
c.986_1006	TCCCACCTGTCGACCTCCAGC	940
c.987_1007	ATCCCACCTGTCGACCTCCAG	941
c.988_1008	GATCCCACCTGTCGACCTCCA	942
c.989_1009	GGATCCCACCTGTCGACCTCC	943
c.990_1010	AGGATCCCACCTGTCGACCTC	944
c.991_1011	CAGGATCCCACCTGTCGACCT	945
c.992_1012	CCAGGATCCCACCTGTCGACC	946
c.993_1013	TCCAGGATCCCACCTGTCGAC	947
c.994_1014	ATCCAGGATCCCACCTGTCGA	948
c.995_1015	CATCCAGGATCCCACCTGTCG	949
c.996_1016	ACATCCAGGATCCCACCTGTC	950
c.997_1017	GACATCCAGGATCCCACCTGT	951
c.998_1018	AGACATCCAGGATCCCACCTG	952
c.999_1019	TAGACATCCAGGATCCCACCT	953
c.1000_1020	GTAGACATCCAGGATCCCACC	954
c.1001_1021	TGTAGACATCCAGGATCCCAC	955
c.1002_1022	ATGTAGACATCCAGGATCCCA	956
c.1003_1023	GATGTAGACATCCAGGATCCC	957
c.1004_1024	AGATGTAGACATCCAGGATCC	958
c.1005_1025	AAGATGTACATCCAGGATC	959
c.1006_1026	GAAGATGTAGACATCCAGGAT	960
c.1007_1027	GGAAGATGTAGCATCCAGGA	961
c.1008_1028	AGGAAGATGTAGACATCCAGG	962
c.1009_1029	CAGGAAGATGTAGACATCCAG	963
c.1010_1030	CCAGGAAGATGTAGACATCCA	964
c.1011_1031	CCCAGGAAGATGTAGACATCC	965
c.1012_1032	GCCCAGGAAGATGTAGACATC	966
c.1013_1033	GGCCCAGGAAGATGTAGACAT	967
c.1014_1034	GGGCCCAGGAAGATGTAGACA	968
c.1015_1035	TGGGCCCAGGAAGATGTTAGAC	969
c.1016_1036	CTGGGCCCAGGAAGATGTAGA	970
c.1017_1037	TCTGGGCCCAGGAAGATGTAG	971
c.1018_1038	CTCTGGGCCCAGGAAGATGTA	972
c.1019_1039	GCTCTGGGCCCAGGAAGATGT	973
c.1020_1040	GGCTCTGGGCCCAGGAAGATG	974
c.1021_1041	GGGCTCTGGGCCCAGGAAGAT	975
c.1022_1042	TGGGCTCTGGGCCCAGGAAGA	976
c.1023_1043	TTGGGCTCTGGGCCCAGGAAG	977

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1024_1044	CTTGGGCTCTGGGCCCAGGAA	978
c.1025_1045	TCTTGGGCTCTGGGCCCAGGA	979
c.1026_1046	CTCTTGGGCTCTGGGCCCAGG	980
c.1027_1047	GCTCTTGGGCTCTGGGCCCAG	981
c.1028_1048	CGCTCTTGGGCTCTGGGCCCA	982
c.1029_1049	ACGCTCTTGGGCTCTGGGCCCC	983
c.1030_1050	CACGCTTCTTGGGCTCTGGGCC	984
c.1031_1051	CCACGCTCTTGGGCTCTGGGC	985
c.1032_1052	ACCACGCTCTTGGGCTCTGGG	986
c.1033_1053	CACCACGCTCTTGGGCTCTGG	987
c.1034_1054	GCACCACGCTCTTGGGCTCTG	988
c.1035_1055	TGCACCACGCTCTTGGGCTCT	989
c.1036_1056	CTGCACCACGCTCTTGGGCTC	990
c.1037_1057	GCTGCACCACGCTCTTGGGCT	991
c.1038-1058	TGCTGCACCACGCTCTTGGGC	992
c.1039_1059	CTTGCTGCACCACGCTCTTGGG	993
c.1040_1060	ACTGCTGCACCACGCTCTTGG	994
c.1041_1061	TACTGCTGCACCACGCTCTTG	995
c.1042_1062	GTACTGCTGCACCACGCTCTT	996
c.1043_1063	GGTACTGCTGCACCACGCTCT	997
c.1044_1064	AGGTACTGCTGCACCACGCTC	998
c.1045_1065	CAGGTACTGCTGCACCACGCT	999
c.1046_1066	CCAGGTACTGCTGCACCACGC	1000
c.1047_1067	TCCAGGTACTGCTGCACCACG	1001
c.1048_1068	GTCCAGGTACTGCTGCACCAC	1002
c.1049-1069	CGTCCAGGTACTGCTGCACCA	1003
c.1050_1070	ACGTCCAGGTACTGCTGCACC	1004
c.1051_1071	AACGTCCAGGTACTGCTGCAC	1005
c.1052_1072	CAACGTCCAGGTACTGCTGCA	1006
c.1053_1073	ACAACGTCCAGGTACTGCTGC	1007
c.1054_1074	CACAACGTCCAGGTACTGCTG	1008
c.1055_1075	CCACAACGTCCAGGTACTGCT	1009
c.1056_1075+1	CCCACAACGTCCAGGTACTGC	1010
c.1057_1075+2	ACCCACAACGTCCAGGTACTG	1011
c.1058_1075+3	TACCCACAACGTCCAGGTACT	1012
c.1059_1075+4	CTACCCACAACGTCCAGGTAC	1013
c.1060_1075+5	CCTACCCACAACGTCCCAGGTA	1014
c.1061_1075+6	CCCTACCCACAACGTCCAGGT	1015
c.1062_1075+7	GCCCTACCCACAACGTCCAGG	1016
c.1063_1075+8	GGCCCTACCCACAACGTCCAG	1017

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1064_1075+9	AGGCCCTACCCACAACGTCCA	1018
c.1065_1075+10	CAGGCCCTACCCACAACGTCC	1019
c.1066_1075+11	GCAGGCCCTACCCACAACGTC	1020
c.1067_1075+12	AGCAGGCCCTACCCACAACGT	1021
c.1068_1075+13	GAGCAGGCCCTACCCACAACG	1022
c.1069_1075+14	GGAGCAGGCCCTACCCACAAC	1023
c.1070_1075+15	GGGAGCAGGCCCTACCCACAA	1024
c.1071_1075+16	AGGGAGCAGGCCCTACCCACA	1025
c.1072_1075+17	CAGGGAGCAGGCCCTACCCAC	1026
c.1073_1075+18	CCAGGGAGCAGGCCCTACCCA	1027
c.1074_1075+19	GCCAGGGAGCAGGCCCTACCC	1028
c.1075_1075+20	GGCCAGGGAGCAGGCCCTACC	1029
c.1075+1_+21	CGGCCAGGGAGCAGGCCCTAC	1030
c.1075+2_+22	GCGGCCAGGGAGCAGGCCCTA	1031
c.1075+3_+23	CGCGGCCAGGGAGCAGGCCCT	1032
c.1075+4_+24	CCGCGGCCAGGGAGGCAGGCCC	1033
c.1075+5_+25	GCCGCGGCCAGGGAGCAGGCC	1034
c.1075+6_+26	GGCCGCGGCCAGGGAGCAGGC	1035
c.1075+7_+27	GGGCCGCGGCCAGGGAGCAGG	1036
c.1075+8_+28	GGGGCCGCGGCCAGGGAGCAG	1037
c.1075+9_+29	GGGGGCCGCGGCCAGGGAGCA	1038
c.1075+10_+30	CGGGGCCGCGGCCAGGGAGC	1039
c.1075+11_+31	GCGGGGGCCGCGGCCAGGGAG	1040
c.1075+12_+32	GGCGGGGGCCGCGGCCAGGGA	1041
c.1075+13_+33	GGGCGGGGGCCGCGGCCAGGG	1042
c.1075+14_+34	GGGGCGGGGGCCGCGGCCAGG	1043
c.1075+15_+35	TGGGGCGGGGGCCGCGGCCAG	1044
c.1075+16_+36	TTGGGGCGGGGGCCGCGGCCA	1045
c.1075+17_+37	CTTGGGGCGGGGGCCGCGGCC	1046
c.1075+18_+38	CCTTGGGGCGGGGGCCGCGGCC	1047
c.1075+19_+39	GCCTTGGGGCGGGGGCCGCGG	1048
c.1075+20_+40	AGCCTTGGGGCGGGGGCCCGCG	1049
c.1075+21_1076-39	GAGCCTTGGGGCGGGGGCCGC	1050
c.1075+22_1076-38	GGAGCCTTGGGGCGGGGGCCG	1051
c.1075+23_1076-37	GGGAGCCTTGGGGCGGGGGCC	1052
c.1075+24_1076-36	AGGGAGGCCTTGGGGCGGGGGC	1053
c.1075+25_1076-35	GAGGGAGCCTTGGGGCGGGGG	1054
c.1075+26_1076-34	GGAGGGAGCCTTGGGGCGGGG	1055
c.1075+27_1076-33	AGGAGGGGAGCCTTGGGGCGGG	1056
c.1075+28_1076-32	GAGGAGGGAGCCTTGGGGCGG	1057

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1075+29_1076-31	GGAGGAGGGAGCCTTGGGGCG	1058
c.1075+30_1076-30	GGGAGGAGGGAGCCTTGGGGC	1059
c.1075+31_1076-29	AGGGAGGGAGGGAGCCTTGGGG	1060
c.1075+32_1076-28	GAGGGAGGAGGGAGCCTTGGG	1061
c.1075+33_1076-27	GGAGGGAGGAGGGAGCCTTGG	1062
c.1075+34_1076-26	GGGAGGGAGGAGGGGAGCCTTG	1063
c.1075+35_1076-25	AGGGAGGGAGGAGGGGAGCCTT	1064
c.1075+36_1076-24	GAGGGAGGGAGGAGGGGAGCCT	1065
c.1075+37_1076-23	TGAGGGAGGGAGGAGGGAGCC	1066
c.1075+38_1076-22	ATGAGGGAGGGAGGAGGGGAGC	1067
c.1075+39_1076-21	CATGAGGGAGGGAGGAGGGGGAG	1068
c.1075+40_1076-20	TCATGAGGGAGGGAGGAGGGGA	1069
c.1076-39_-19	TTCATGAGGGAGGGGAGGAGGGG	1070
c.1076-38_-18	CTTCATGAGGGAGGGAGGAGGG	1071
c.1076-37_-17	ACTTCATGAGGGAGGGAGGAG	1072
c.1076-36_-16	GACTTCATGAGGGGAGGGAGGA	1073
c.1076-35_-15	CGACTTCATGAGGGAGGGAGG	1074
c.1076-34_-14	CCGACTTCATGAGGGAGGGAG	1075
c.1076-33_-13	GCCGACTTCATGAGGGAGGGA	1076
c.1076-32_-12	CGCCGACTTCATGAGGGAGGG	1077
c.1076-31_-11	ACGCCGACTTCATGAGGGAGG	1078
c.1076-30_-10	AACGCCGACTTCATGAGGGAG	1079
c.1076-29_-9	CAACGCCGACTTCATGAGGGA	1080
c.1076-28_-8	CCAACGCCGACTTCATGAGGG	1081
c.1076-27_-7	GCCAACGCCGACTTCATGAGG	1082
c.1076-26_-6	GGCCAACGCCGACTTCATGAG	1083
c.1076-25_-5	AGGCCAACGCCGACTTCATGA	1084
c.1076-24_-4	CAGGCCAACGCCGACTTCATG	1085
c.1076-23_-3	GCAGGCCAACGCCGACTTCAT	1086
c.1076-22_-2	TGCAGGCCAACGCCGACTTCA	1087
c.1076-21_-1	CTGCAGGCCAACGCCGACTTC	1088
c.1076-20_1076	CCTGCAGGCCAACGCCGACTT	1089
c.1076-19_1077	TCCTGCAGGCCAACGCCGACT	1090
c.1076-18_1078	ATCCTGCAGGCCAACGCCGAC	1091
c.1076-17_1079	TTCCTGCAGGCCAACGCCGA	1092
c.1076-16_1080	GTATCCTGCAGGCCAACGCCG	1093
c.1076-15_1081	GGTATCCTGCAGGCCAACGCC	1094
c.1076-14_1082	GGGTATCCTGCAGGCCAACGC	1095
c.1076-13_1083	CGGGTATCCTGCAGGCCAACG	1096
c.1076-12_1084	ACGGGTATCCTGCAGGCCAAC	1097

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1076-11_1085	AACGGGTATCCTGCAGGCCAA	1098
c.1076-10_1086	GAACGGGTATCCTGCAGGCCA	1099
c.1076-9_1087	TGAACGGGTATCCTGCAGGCC	1100
c.1076-8_1088	ATGAACGGGTATCCCTGCAGGC	1101
c.1076-7_1089	CATGAACGGGTATCCTGCAGG	1102
c.1076-6_1090	GCATGAACGGGTATCCTGCAG	1103
c.1076-5_1091	GGCATGAACGGGTATCCTGCA	1104
c.1076-4_1092	CGGCATGAACGGGTATCCTGC	1105
c.1076-3_1093	GCGGCATGAACGGGTATCCTG	1106
c.1076-2_1094	GGCGGCATGAACGGGTATCCT	1107
c.1076-1_1095	TGGCGGCATGAACGGGTATCC	1108
c.1076_1096	ATGGCGGCATGAACGGGTATC	1109
c.1077_1097	TAGGCGGCATGAACGGGTAT	1110
c.1078_1098	GTATGGCGGCATGAACGGGTA	1111
c.1079_1099	AGTATGGCGGCATGAACGGGT	1112
c.1080_1100	CAGTAGGCGGCATGAACGGG	1113
c.1081_1101	CCAGTATGGCGGCATGAACGG	1114
c.1082_1102	CCCAGTATGGCGGCATGAACG	1115
c.1083_1103	CCCCAGTATGGCGGCATGAAC	1116
c.1084_1104	GCCCCAGTATGGCGGCATGAA	1117
c.1085_1105	GGCCCCAGTTAGGCGGCATGA	1118
c.1086_1106	AGGCCCCAGTATGGCGGCATG	1119
c.1087_1107	CAGGCCCCAGTATGGCGGCAT	1120
c.1088_1108	CCAGGCCCCAGTATGGCGGCA	1121
c.1089_1109	CCCAGGCCCCAGTATGGCGGC	1122
c.1090_1110	GCCCAGGCCCCAGTATGGCGG	1123
c.1091_1111	AGCCCAGGCCCCAGTATGCG	1124
c.1092_1112	AAGCCCAGGCCCCAGTATGGC	1125
c.1093_1113	GAAGCCCAGGCCCCAGTATGG	1126
c.1094_1114	GGAAGCCCAGGCCCCAGTATG	1127
c.1095_1115	TGGAAGCCCAGGCCCCAGTAT	1128
c.1096_1116	GTGGAAGCCCAGGCCCCAGTA	1129
c.1097_1117	GGTGGAAGCCCAGGCCCCAGT	1130
c.1098_1118	AGGTGGAAGCCCAGGCCCCAG	1131
c.1099_1119	CAGGTGGAAGCCCAGGCCCCA	1132
c.1100_1120	ACAGGTGGAAGCCCAGGCCCC	1133
c.1101_1121	CACAGGTGGAAGCCCAGGCCCC	1134
c.1102_1122	GCACAGGTGGAAGCCCAGGCC	1135
c.1103_1123	GGCACAGGTGGAAGCCCAGGC	1136
c.1104_1124	CGGCACAGGTGGAAGCCCAGG	1137

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1105_1125	GCGGCACAGGTGGAAGCCCAG	1138
c.1106_1126	AGCGGCACAGGTGGAAGCCCA	1139
c.1107_1127	CAGCGGCACAGGTGGAAGCCC	1140
c.1108_1128	CCAGCGGCACAGGTGGAAGCC	1141
c.1109_1129	CCCAGCGGCACAGGTGGAAGC	1142
c.1110_1130	CCCCAGCGGCACAGGTGGAAG	1143
c.1111_1131	GCCCCAGCGGCACAGGTGGAA	1144
c.1112_1132	AGCCCCAGCGGCACAGGTGGA	1145
c.1113_1133	TAGCCCCAGCGGCACAGGTGG	1146
c.1114_1134	GTAGCCCCAGCGGCACAGGTG	1147
c.1115_1135	AGTAGCCCCAGCGGCACAGGT	1148
c.1116_1136	GAGTAGCCCCAGCGGCACAGG	1149
c.1117_1137	GGAGTAGCCCCAGCGGCACAG	1150
c.1118_1138	AGGAGTAGCCCCAGCGGCACA	1151
c.1119_1139	GAGGAGTAGCCCCAGCGGCAC	1152
c.1120_1140	GGAGGAGTAGCCCCAGCGGCA	1153
c.1121_1141	TGGAGGAGTAGCCCCAGCGGC	1154
c.1122_1142	GTGGAGGAGTAGCCCCAGCGG	1155
c.1123_1143	GGTGGAGGAGTAGCCCCAGCG	1156
c.1124_1144	CGGTGGAGGAGTAGCCCCAGC	1157
c.1125_1145	GCGGTGGAGGAGTAGCCCCAG	1158
c.1126_1146	AGCGGTGGAGGAGTAGCCCCA	1159
c.1127_1147	TAGCGGTGGAGGAGTAGCCCC	1160
c.1128_1148	ATAGCGGTGGAGGAGTAGCCC	1161
c.1129_1149	GATAGCGGTGGAGGATGAGCC	1162
c.1130_1150	TGATAGCGGTGGAGGAGTAGC	1163
c.1131_1151	GTGATAGCGGTGGAGGAGTAG	1164
c.1132_1152	GGTGATAGCGGTGGAGGAGTA	1165
c.1133_1153	GGGTGATAGCGGTGGAGGAGT	1166
c.1134_1154	CGGGTGATAGCGGTGGAGGAG	1167
c.1135_1155	GCGGGTGATAGCGGTGGAGGA	1168
c.1136_1156	GGCGGGTGATAGCGGTGGAGG	1169
c.1137_1157	TGGCGGGTGATAGCGGTGGAG	1170
c.1138_1158	CTGGCGGGTGATAGCGGTGGA	1171
c.1139_1159	CCTGGCGGGTGATAGCGGTGG	1172
c.1140_1160	ACCTGGCGGGTGATAGCGGTG	1173
c.1141_1161	CACCTGGCGGGTGATAGCGGT	1174
c.1142_1162	CCACCTGGCGGGTGATAGCGG	1175
c.1143_1163	ACCACCTGGCGGGTGATAGCG	1176
c.1144_1164	CACCACCTGGCGGGTGATAGC	1177

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1145_1165	CCACCACCTGGCGGGTGATAG	1178
c.1146_1166	TCCACCACCTGGCGGGTGATA	1179
c.1147_1167	CTCCACCACCTGGCGGGTGAT	1180
c.1148_1168	TCTCCACCACCTGGCGGGTGA	1181
c.1149_1169	TTCTCCACCACCTGGCGGGTG	1182
c.1150_1170	GTTTCCCACCACCTGGCGGGT	1183
c.1151_1171	TGTTCTCCACCACCTGGCGGG	1184
c.1152_1172	ATGTTCTCCACCACCTGGCGG	1185
c.1153_1173	CATGTTCTCCACCACCTGGCG	1186
c.1154_1174	TCATGTTCTCCACCACCTGGC	1187
c.1155_1175	GTCATGTTCTCCACCACCTGG	1188
c.1156_1176	GGTCATGTTCTCCACCACCTG	1189
c.1157_1177	TGGTCATGTTCTCCACCACCT	1190
c.1158_1178	CTGGTCATGTTTCTCCACCACC	1191
c.1159_1179	CCTGGTCATGTTCTCCACCAC	1192
c.1160_1180	CCCTGGTCATGTTTCTCCACCA	1193
c.1161_1181	GCCCTGGTCATGTTCTCCACC	1194
c.1162_1182	GGCCCTGGTCATGTTCTCCAC	1195
c.1163_1183	GGGCCCTGGTCATGTTCTCCA	1196
c.1164_1184	TGGGCCCTGGTCATGTTCTCC	1197
c.1165_1185	GTGGGGCCCTGGTCATGTTCTC	1198
c.1166_1186	AGTGGGCCCTGGTCATGTTCT	1199
c.1167_1187	AAGTGGGCCCTGGTCATGTTC	1200
c.1168_1188	GAAGTGGGCCCTGGTCATGTT	1201
c.1169_1189	GGAAGTGGGCCCTGGTCATGT	1202
c.1170_1190	GGGAAGTGGGCCCTGGTCATG	1203
c.1171_1191	GGGGAAGTGGGCCCTGGTCAT	1204
c.1172_1192	GGGGGAAGTGGGCCCTGGTCA	1205
c.1173_1193	AGGGGGAAGTGGGCCCTGGTC	1206
c.1174_1194	CAGGGGGAAGTGGGCCCTGGT	1207
c.1175_1194+1	CCAGGGGGGAAGTGGGCCCTGG	1208
c.1176_1194+2	ACCAGGGGGAAGTGGGCCCTG	1209
c.1177_1194+3	CACCAGGGGGGAAGTGGGCCCT	1210
c.1178_1194+4	TCACCAGGGGGAAGTGGGCCC	1211
c.1179_1194+5	CTCACCAGGGGGGAAGTGGGCC	1212
c.1180_1194+6	ACTCACCAGGGGGAAGTGGGC	1213
c.1181_1194+7	AACTCACCAGGGGGAAGTGGG	1214
c.1182_1194+8	CAACTCACCAGGGGGAAGTGG	1215
c.1183-1194+9	CCAACTCACCAGGGGGAAGTG	1216
c.1184_1194 10	CCCAACTCACCAGGGGGAAGT	1217

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1185_1194+11	CCCCAACTCACCAGGGGGAAG	1218
c.1186_1194+12	ACCCCAACTCACCAGGGGGAA	1219
c.1187_1194+13	CACCCCAACTCACCAGGGGGGA	1220
c.1188_1194+14	CCACCCCAACTCACCAGGGGG	1221
c.1189_1194+15	ACCACCCCAACTCACCAGGGG	1222
c.1190_1194+16	CACCACCCCAACTCACCAGGG	1223
c.1191_1194+17	CCACCACCCCAACTCACCAGG	1224
c.1192_1194+18	GCCACCACCCCAACTCACCAG	1225
c.1193_1194+19	TGCCACCACCCCAACTCACCA	1226
c.1194_1194+20	CTGCCACCACCCCAACTCACC	1227
c.1194+1_+21	CCTGCCACCACCCCAACTCAC	1228
c.1194+2_+22	CCCTGCCACCACCCCAACTCA	1229
c.1194+3_+23	CCCCTGCCACCACCCCAACTC	1230
c.1194+4_+24	TCCCCTGCCACCACCCCAACT	1231
c.1194+5_+25	CTCCCCTGCCACCACCCCAAC	1232
c.956-25_-8	GGAAGCAGCCTCTGGGGTT	1233
c.956-24_-7	GGGAAGCAGCTCTGGGGT	1234
c.956-23_-6	AGGGAAGCAGCTCTGGGG	1235
c.956-22_-5	AAGGGAAGCAGCTCTGGG	1236
c.956-21_-4	GAAGGGAAGCAGCTCTGG	1237
c.956-20_-3	GGAAGGGAAGCAGCTCTG	1238
c.956-19_-2	TGGAAGGGAAGCAGCTCT	1239
c.956-18_-1	CTGGAAGGGAAGCAGCTC	1240
c.956-17_956	TCTGGAAGGAGCAGCT	1241
c.956-16_957	ATCTGGAAGGGAAGCAGC	1242
c.956-15_958	CATCTGGAAGGGAAGCAG	1243
c.956-14_959	ACATCTGGAAGGGAAGCA	1244
c.956-13_960	CACATCTGGAAGGGAAGC	1245
c.956-12_961	CCACATCTGGAAGGGAAG	1246
c.956-11_962	ACCACATCTGGAAGGA	1247
c.956-10_963	GACCACATCTGGAAGGGA	1248
c.956-9_964	GGACCACATTCTGGAAGGG	1249
c.956-8_965	AGGACCACATCTGGAAGG	1250
c.956-7_966	CAGGACCACATTCTGGAAG	1251
c.956-6_967	GCAGGACCACATCTGGAA	1252
c.956-5_968	TGCAGGACCACATCTTGGA	1253
c.956-4_969	CTGCAGGACCACATCTGG	1254
c.956-3_970	GCTGCAGGACCACATCTG	1255
c.956-2_971	GGCTGCAGGACCACATCT	1256
c.956-1_972	CGGCTGCAGGACCACATC	1257

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.956_973	TCGGCTGCAGGACCACAT	1258
c.957_974	CTCGGCTGCAGGACCACA	1259
c.958_975	GCTCGGCTGCAGGACCAC	1260
c.959_976	GGCTCGGCTGCAGGACCA	1261
c.960_977	GGGCTCGGCTGCAGGACC	1262
c.961_978	AGGGCTCGGCTGCAGGAC	1263
c.962_979	CAGGGCTCGGCTGCAGGA	1264
c.963_980	GCAGGGCTCGGCTGCAGG	1265
c.964_981	GGCAGGGCTCGGCTGCAG	1266
c.965_982	GGGCAGGGCTCGGCTGCA	1267
c.966_983	AGGGCAGGGCTCGGCTGC	1268
c.967_984	AAGGGCAGGGCTCGGCTG	1269
c.968_985	TAAGGGCAGGGCTCGGCT	1270
c.969_986	CTAAGGGCAGGGCTCGGC	1271
c.970_987	GCTAAGGGCAGGGCTCGG	1272
c.971_988	AGCTAAGGGCAGGGCTCG	1273
c.972_989	CAGCTAAGGGCAGGGCTC	1274
c.973_990	CCAGCTAAAGGGCAGGGCT	1275
c.974_991	TCCAGCTAAGGGCAGGGC	1276
c.975_992	CTCCAGCTAAAGGGCAGGG	1277
c.976_993	CCTCCAGCTAAGGGCAGG	1278
c.977_994	ACCTCCAGCTAAGGGCAG	1279
c.978_995	GACCTCCAGCTAAGGGCA	1280
c.979_996	CGACCTCCAGCTAAGGGC	1281
c.980_997	TCGACCTCCAGCTAAGGG	1282
c.981_998	GTCGACCTCCAGCTAAGG	1283
c.982_999	TGTCGACCTCCAGCTAAG	1284
c.983_1000	CTGTCGACCTCCAGCTAA	1285
c.984_1001	CCTGTCGACCTCCAGCTA	1286
c.985_1002	ACCTGTCGACCTCCAGCT	1287
c.986_1003	CACCTGTCGACCTCCAGC	1288
c.987_1004	CCACCTGTCGACCTCCAG	1289
c.988_1005	CCCACCTGTCGACCTCCA	1290
c.989_1006	TCCCACCTGTCGACCTCC	1291
c.990_1007	ATCCCACCTGTCGACCTC	1292
c.991_1008	GATCCCACCTGTCGACCT	1293
c.992_1009	GGATCCCACCTGTCGACC	1294
c.993_1010	AGGATCCCACCTGTCGAC	1295
c.994_1011	CAGGATCCCACCTGTCGA	1296
c.995_1012	CCAGGATCCCACCTGTCG	1297

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.996_1013	TCCAGGATCCCACCTGTC	1298
c.997_1014	ATCCAGGATCCCACCTGT	1299
c.998_1015	CATCCAGGATCCCACCTG	1300
c.999_1016	ACATCCAGGATCCCACCT	1301
c.1000_1017	GACATCCAGGATCCCACC	1302
c.1001_1018	AGACATCCAGGATCCCAC	1303
c.1002_1019	TAGACATCCAGGATCCCA	1304
c.1003_1020	GTAGACATCCAGGGATCCC	1305
c.1004_1021	TGTAGACATCCAGGATCC	1306
c.1005_1022	ATGTAGACATCCAGGATC	1307
c.1006_1023	GATGTAGACATCCAGGAT	1308
c.1007_1024	AGAGTTAGACATCCAGGA	1309
c.1008_1025	AAGATGTAGACATCCAGG	1310
c.1009_1026	GAAGATGTTAACATCCAG	1311
c.1010_1027	GGAAGATGTAGACATCCA	1312
c.1011_1028	AGGAAGGATGTACAATCC	1313
c.1012_1029	CAGGAAGATGTAGACATC	1314
c.1013_1030	CCAGGAAGATGTAGACAT	1315
c.1014_1031	CCCAGGAAGATGTAGACA	1316
c.1015_1032	GCCCAGGAAGATGTTAGAC	1317
c.1016_1033	GGCCCAGGAAGATGTAGA	1318
c.1017_1034	GGGCCCAGGAAGATGTAG	1319
c.1018_1035	TGGGCCCAGGAAGATGTA	1320
c.1019_1036	CTGGGCCCAGGAAGATGT	1321
c.1020_1037	TCTGGGCCCAGGAAGATG	1322
c.1021_1038	CTCTGGGCCCAGGAAGAT	1323
c.1022_1039	GCTCTGGGCCCAGAGAGA	1324
c.1023_1040	GGCTCTGGGCCCAGGAAG	1325
c.1024_1041	GGGCTCTGGGCCCAGGAA	1326
c.1025_1042	TGGGCTCTGGGCCCAGGA	1327
c.1026_1043	TTGGGCTCTGGGCCCAGG	1328
c.1027_1044	CTTGGGCTCTGGGCCCAG	1329
c.1028_1045	TCTTGGGCTCTGGGCCCA	1330
c.1029_1046	CTCTTGGGCTCTGGGCCC	1331
c.1030_1047	GCTCTTGGGCTCTGGGCC	1332
c.1031_1048	CGCTCTTGGGCTCTGGGC	1333
c.1032_1049	ACGCTCTTGGGCTCTGGG	1334
c.1033_1050	CACGCTCTTGGGCTCTGG	1335
c.1034_1051	CCACGCTCTTGGGCTCTG	1336
c.1035_1052	ACCACGCTCTTGGGCTCT	1337

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1036_1053	CACCACGCTCTTGGGCTC	1338
c.1037_1054	GCACCACGCTCTTGGGCT	1339
c.1038_1055	TGCACCACGCTCTTGGGC	1340
c.1039_1056	CTGCACCACGCTCTTGG	1341
c.1040_1057	GCTGCACCACGCTCTTGG	1342
c.1041_1058	TGCTGCACCACGCTCTTG	1343
c.1042_1059	CTTGCTGCACCACGCTCTT	1344
c.1043_1060	ACTGCTGCACCACGCTCT	1345
c.1044_1061	TACTGCTGCACCACGCTC	1346
c.1045_1062	GTACTGCTGCACCACGCT	1347
c.1046_1063	GGTACTGCTGCACCACGC	1348
c.1047_1064	AGGTACTGCTGCACCACG	1349
c.1048_1065	CAGGTACTGCTGCACCAC	1350
c.1049_1066	CCAGGTACTGCTGCACCA	1351
c.1050_1067	TCCAGGTACTGCTGCACC	1352
c.1051-1068	GTCCAGGTACTGCTGCAC	1353
c.1052_1069	CGTCCAGGTACTGCTGCA	1354
c.1053_1070	ACGTCCAGGTACTGCTGC	1355
c.1054_1071	AACGTCCAGGTACTGCTG	1356
c.1055_1072	CAACGTCCAGGTACTGCT	1357
c.1056_1073	ACAACGTCCAGGTACTGC	1358
c.1057_1074	CACAACGTCCAGGTACTG	1359
c.1058_1075	CCACAACGTCCAGGTACT	1360
c.1059_1075+1	CCCACAACGTCCAGGTAC	1361
c.1060_1075+2	ACCCACAACGTCCAGGTA	1362
c.1061_1075+3	TACCCACAACGTCCAGGT	1363
c.1062_1075+4	CTACCCACAACGTCCCAGG	1364
c.1063_1075+5	CCTACCCACAACGTCCAG	1365
c.1064_1075+6	CCCTACCCACAACGTCCA	1366
c.1065_1075+7	GCCCTACCCACAACGTCC	1367
c.1066_1075+8	GGCCCTACCCACAACGTC	1368
c.1067_1075+9	AGGCCCTACCCACAACGT	1369
c.1068_1075+10	CAGGCCCTACCCACAACG	1370
c.1069_1075+11	GCAGGCCCTACCCACAAC	1371
c.1070_1075+12	AGCAGGCCCTACCCACAA	1372
c.1071_1075+13	GAGCAGGCCCTACCCACA	1373
c.1072_1075+14	GGAGCAGGCCCTACCCAC	1374
c.1073_1075+15	GGGAGCAGGCCCTACCCA	1375
c.1074 1075+16	AGGGAGCAGGCCCTACCC	1376
c.1075_1075+17	CAGGGAGCAGGCCCTACC	1377

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1075+1_ +18	CCAGGGAGCAGGCCCTAC	1378
c.1075+2_+19	GCCAGGGAGCAGGCCCTA	1379
c.1075+3_+20	GGCCAGGGAGCAGGCCCT	1380
c.1075+4_+21	CGGCCAGGGAGCAGGCCC	1381
c.1075+5_+22	GCGGCCAGGGAGCAGGCC	1382
c.1075+6_+23	CGCGGCCAGGGAGCAGGC	1383
c.1075+7_+24	CCGCGGCCAGGGAGCAGG	1384
c.1075+8_+25	GCCGCGGCCAGGGAGCAG	1385
c.1075+9_+26	GGCCGCGGCCAGGGAGCA	1386
c.1075+10_+27	GGGCCGCGGCCAGGGAGC	1387
c.1075+11_+28	GGGGCCGCGGCCAGGGAG	1388
c.1075+12_+29	GGGGGCCGCGGCCAGGGA	1389
c.1075+13_+30	CGGGGGCCGCGGCCAGGG	1390
c.1075+14_+31	GCGGGGGCCGCGGCCAGG	1391
c.1075+15_+32	GGCGGGGGCCGCGGCCAG	1392
c.1075+16_+33	GGGCGGGGGCCGCGGCCA	1393
c.1075+17_+34	GGGGCGGGGGCCGCGGCC	1394
c.1075+18_+35	TGGGGCGGGGGCCGCGGC	1395
c.1075+19_+36	TTGGGGCGGGGGCCGCGG	1396
c.1075+20_+37	CTTGGGGCGGGGGCCGCG	1397
c.1075+21_+38	CCTTGGGGCGGGGGCCGC	1398
c.1075+22_+39	GCCTTGGGGCGGGGGCCCG	1399
c.1075+23_+40	AGCCTTGGGGCGGGGGCC	1400
c.1075+24_1076-39	GAGCCTTGGGGCGGGGGC	1401
c.1075+25_1076-38	GGAGCCTTGGGGCGGGGG	1402
c.1075+26_1076-37	GGGAGCCTTGGGGCGGGG	1403
c.1075+27_1076-36	AGGGAGCCTTGGGGCGGG	1404
c.1075+28_1076-35	GAGGGAGCCTTGGGGCGG	1405
c.1075+29_1076-34	GGAGGGAGCCTTGGGGCG	1406
c.1075+30_1076-33	AGGAGGGAGCCTTGGGGC	1407
c.1075+31_1076-32	GAGGAGGGAGCCTTGGGG	1408
c.1075+32_1076-31	GGAGGAGGGAGCCTTGGG	1409
c.1075+33_1076-30	GGGAGGAGGGAGCCTTGG	1410
c.1075+34_1076-29	AGGGAGGAGGGAGCCTTG	1411
c.1075+35_1076-28	GAGGGAGGAGGGAGAGCCTT	1412
c.1075+36_1076-27	GGAGGGAGGAGGGGAGCCT	1413
c.1075+37_1076-26	GGGAGGGAGGAGGGAGCC	1414
c.1075+38_1076-25	AGGGAGGGAGGAGGGAGC	1415
c.1075+39_1076-24	GAGGGAGGGGAGGAGGGAG	1416
c.1075+40_1076-23	TGAGGGAGGGAGGAGGGGA	1417

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1076-39_-22	ATGAGGGAGGGAGGAGGGGG	1418
c.1076-38_-21	CATGAGGGAGGGAGGAGGG	1419
c.1076-37_-20	TCATGAGGGAGGGAGGAG	1420
c.1076-36_-19	TTCATGAGGGAGGGAGGA	1421
c.1076-35_-18	CTTCATGAGGGAGGGAGG	1422
c.1076-34_-17	ACTTCATGAGGGGAGGGAG	1423
c.1076-33_-16	GACTTCATGAGGGAGGGA	1424
c.1076-32_-15	CGACTTCATGAGGGAGGG	1425
c.1076-31_-14	CCGACTTCATGAGGGAGG	1426
c.1076-30_-13	GCCGACTTCATGAGGGAG	1427
c.1076-29_-12	CGCCGACTTCATGAGGGA	1428
c.1076-28_-11	ACGCCGACTTCATGAGGG	1429
c.1076-27_-10	AACGCCGACTTCATGAGG	1430
c.1076-26_-9	CAACGCCGACTTCATGAG	1431
c.1076-25_-8	CCAACGCCGACTTCATGA	1432
c.1076-24_-7	GCCAACGCCGACTTCATG	1433
c.1076-23_-6	GGCCAACGCCGACTTCAT	1434
c.1076-22_-5	AGGCCAACGCCGACTTCA	1435
c.1076-21_-4	CAGGCCAACGCCGACTTC	1436
c.1076-20_-3	GCAGGCCAACGCCGACTT	1437
c.1076-19_-2	TGCAGGCCAACGCCGACT	1438
c.1076-18_-1	CTGCAGGCCAACGCCGAC	1439
c.1076-17_1076	CCTGCAGGCCAACGCCGA	1440
c.1076-16_1077	TCCTGCAGGCCAACGCCG	1441
c.1076-15_1078	ATCCTGCAGGCCAACGCC	1442
c.1076-14_1079	TATCCTGCAGGCCAACGC	1443
c.1076-13_1080	GTATCCTGCAGGCCAACG	1444
c.1076-12_1081	GGTATCCTGCAGGCCAAC	1445
c.1076-11_1082	GGGTATCCTGCAGGCCAA	1446
c.1076-10_1083	CGGGTATCCTGCAGGCCA	1447
c.1076-9_1084	ACGGGTATCCTGCAGGCC	1448
c.1076-8_1085	AACGGGGTATCCTGCAGGC	1449
c.1076-7_1086	GAACGGGTATCCTGCAGG	1450
c.1076-6_1087	TGAACGGGTATCCTGCAG	1451
c.1076-5_1088	ATGAACGGGTATCCTGCA	1452
c.1076-4_1089	CATGAACGGGTATCCTGC	1453
c.1076-3_1090	GCATGAACGGGTATCCTG	1454
c.1076-2_1091	GGCATGAACGGGTATCCT	1455
c.1076-1_1092	CGGCATGAACGGGTATCC	1456
c.1076_1093	GCGGCATGAACGGGTATC	1457

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1077_1094	GGCGGCATGAACGGGTAT	1458
c.1078_1095	TGGCGGCATGAACGGGTA	1459
c.1079_1096	ATGGCGGCATGAACGGGT	1460
c.1080_1097	TATGGCGGCATGAACGGG	1461
c.1081_1098	GTATGGCGGCATGAACGG	1462
c.1082_1099	AGTATGGCGGCATGAACG	1463
c.1083-1100	CAGTATGGCGGCATGAAC	1464
c.1084_1101	CCAGTATGGCGGCATGAA	1465
c.1085_1102	CCCAGTATGGCGGCATGA	1466
c.1086_1103	CCCCAGTATGGCGGCATG	1467
c.1087_1104	GCCCCAGTTAGGCGGCAT	1468
c.1088_1105	GGCCCCAGTATGGCGGCA	1469
c.1089_1106	AGGCCCCAGTTAGGCGGC	1470
c.1090_1107	CAGGCCCCAGTATGGCGG	1471
c.1091_1108	CCAGGCCCCAGTATGGCG	1472
c.1092_1109	CCCAGGCCCCAGTATGGC	1473
c.1093_1110	GCCCAGGCCCCAGTATGG	1474
c.1094_1111	AGCCCAGGCCCCAGTATG	1475
c.1095_1112	AAGCCCAGGCCCCAGTAT	1476
c.1096_1113	GAAGCCCAGGCCCCAGTA	1477
c.1097_1114	GGAAGCCCAGGCCCCAGT	1478
c.1098_1115	TGGAAGCCCAGGCCCCAG	1479
c.1099_1116	GTGGAAGCCCAGGCCCCA	1480
c.1100_1117	GGTGGAAGCCCAGGCCCC	1481
c.1101_1118	AGGTGGAAGCCCAGGCCC	1482
c.1102_1119	CAGGTGGAAGCCCAGGCC	1483
c.1103_1120	ACAGGTGGAAGCCCAGGC	1484
c.1104_1121	CACAGGTGGAAGCCCAGG	1485
c.1105_1122	GCACAGGTGGAAGCCCCAG	1486
c.1106_1123	GGCACAGGTGGAAGCCCA	1487
c.1107_1124	CGGCACAGGTGGAAGCCC	1488
c.1108_1125	GCGGCACAGGTGGAAGCC	1489
c.1109_1126	AGCGGCACAGGTGGAAGC	1490
c.1110_1127	CAGCGGCACAGGTGGAAG	1491
c.1111_1128	CCAGCGGCACAGGTGGAA	1492
c.1112_1129	CCCAGCGGCACAGGTGGA	1493
c.1113_1130	CCCCAGCGGCACAGGTGG	1494
c.1114_1131	GCCCCAGCGGCACAGGTG	1495
c.1115_1132	AGCCCCAGCGGCACAGGT	1496
c.1116_1133	TAGCCCCAGCGGCACAGG	1497

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1117_1134	GTAGCCCCAGCGGCACAG	1498
c.1118_1135	AGTAGCCCCAGCGGCACA	1499
c.1119_1136	GAGTAGCCCCAGCGGCAC	1500
c.1120_1137	GGAGTAGCCCCAGCGGCA	1501
c.1121_1138	AGGAGTAGCCCCAGCGGC	1502
c.1122_1139	GAGGAGTAGCCCCAGCGG	1503
c.1123_1140	GGAGGAGTAGCCCCAGCG	1504
c.1124_1141	TGGAGGAGTAGCCCCAGC	1505
c.1125_1142	GTGGAGGAGTAGCCCCAG	1506
c.1126_1143	GGTGGAGGAGTAGCCCCA	1507
c.1127_1144	CGGTGGAGGAGTAGCCCC	1508
c.1128_1145	GCGGTGGAGGAGTAGCCC	1509
c.1129_1146	AGCGGTGGAGGAGTAGCC	1510
c.1130_1147	TAGCGGTGGAGGAGTAGC	1511
c.1131_1148	ATAGCGGTGGAGGAGTAG	1512
c.1132_1149	GATAGCGGTGGAGGAGTA	1513
c.1133_1150	TGATAGCGGTGGAGGAGT	1514
c.1134_1151	GTGATAGCGGTGGAGGAG	1515
c.1135_1152	GGTGATAGCGGTGGAGGA	1516
c.1136_1153	GGGTGATAGCGGTGGAGG	1517
c.1137_1154	CGGGTGATAGCGGTGGAG	1518
c.1138_1155	GCGGGTGATAGCGGTGGA	1519
c.1139_1156	GGCGGGTGATAGCGGTGG	1520
c.1140_1157	TGGCGGGTGATAGCGGTG	1521
c.1141_1158	CTGGCGGGTGATAGCGGT	1522
c.1142_1159	CCTGGGCGGGTGATAGCGG	1523
c.1143_1160	ACCTGGCGGGTGATAGCG	1524
c.1144_1161	CACCTGGCGGGTGATAGC	1525
c.1145_1162	CCACCTGGCGGGTGATAG	1526
c.1146_1163	ACCACCTGGCGGGTGATA	1527
c.1147_1164	CACCACCTGGCGGGTGAT	1528
c.1148_1165	CCACCACCTGGCGGGTGA	1529
c.1149_1166	TCCACCACCTGGCGGGTG	1530
c.1150_1167	CTCCACCACCTGGCGGGT	1531
c.1151_1168	TCTCCACCACCTGGCGGG	1532
c.1152_1169	TTCTCCACCACCTGGCGG	1533
c.1153_1170	GTTTCCCACCACCTGGCG	1534
c.1154_1171	TGTTCTCCACCACCTGGC	1535
c.1155_1172	ATGTTCTCCACCACCTGG	1536
c.1156_1173	CATGTTCTCCACCACCTG	1537

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1157_1174	TCATGTTCTCCACCACCT	1538
c.1158_1175	GTCATGTTCTCCACCACC	1539
c.1159_1176	GGTCATGTTCTCCACCAC	1540
c.1160_1177	TGGTCATGTTCTCCACCA	1541
c.1161_1178	CTGGTCATGTTTCTCCACC	1542
c.1162_1179	CCTGGTCATGTTCTCCAC	1543
c.1163_1180	CCCTGGTCATGTTCTCCA	1544
c.1164_1181	GCCCTGGTCATGTTCTCC	1545
c.1165_1182	GGCCCTGGTCATGTTCTC	1546
c.1166_1183	GGGCCCTGGTCATGTTCT	1547
c.1167_1184	TGGGCCCTGGTCATGTTC	1548
c.1168_1185	GTGGGCCCTGGTCATGTT	1549
c.1169_1186	AGTGGGCCCTGGTCATGT	1550
c.1170_1187	AAGTGGGCCCTGGTCATG	1551
c.1171_1188	GAAGTGGGCCCTGGTCAT	1552
c.1172_1189	GGAAGTGGGCCCTGGTCA	1553
c.1173_1190	GGGAAGTGGGCCCTGGTC	1554
c.1174_1191	GGGGAAGTGGGCCCTGGT	1555
c.1175_1192	GGGGGAAGTGGGCCCTGG	1556
c.1176_1193	AGGGGGAAGTGGGCCCTG	1557
c.1177_1194	CAGGGGGAAGTGGGCCCT	1558
c.1178_1194+1	CCAGGGGGAAGTGGGCCC	1559
c.1179_1194+2	ACCAGGGGGAAGTGGGCC	1560
c.1180_1194+3	CACCAGGGGGAAGTGGGC	1561
c.1181_1194+4	TCACCAGGGGGAAGTGGG	1562
c.1182_1194+5	CTCACCAGGGGGAAGTGG	1563
c.1183_1194+6	ACTCACCAGGGGGGAAGTG	1564
c.1184_1194+7	AACTCACCAGGGGGAAGT	1565
c.1185_1194+8	CAACTCACCAGGGGGAAG	1566
c.1186_1194+9	CCAACTCACCAGGGGGAA	1567
c.1187_1194+10	CCCAACTCACCAGGGGGGA	1568
c.1188_1194+11	CCCCAACTCACCAGGGGG	1569
c.1189_1194+12	ACCCCAACTCACCAGGGG	1570
c.1190_1194+13	CACCCCAACTCACCAGGG	1571
c.1191_1194+14	CCACCCCAACTCACCAGG	1572
c.1192_1194+15	ACCACCCCAACTCACCAG	1573
c.1193_1194+16	CACCACCCCAACTCACCA	1574
c.1194_1194+17	CCACCACCCCAACTCACC	1575
c.1194+1_+18	GCCACCACCCCAACTCAC	1576
c.1194+2_+19	TGCCACCACCCCAACTCA	1577

Secuencia en el ADNc con el cual se hibrida el AON para la exclusión del intrón 6	Secuencia del AON 5'-> 3'	SEQ ID
c.1194+3_+20	CTGCCACCACCCCAACTC	1578
c.1194+4_+21	CCTGCCACCACCCCAACT	1579
c.1194+5_+22	CCCTGCCACCACCCCAAC	1580
c.1194+6_+23	CCCCTGCCACCACCCCAA	1581
c.1194+7_+24	TCCCCTGCCACCACCCCA	1582
c.1194+8_+25	CTCCCCTGCCACCACCCC	1583

En los ejemplos anteriores, las secuencias tienen una longitud de 18, 21 y 25 nucleótidos; sin embargo, también se prevén variantes más largas o fragmentos más cortos.

Los más preferidos son los compuestos oligoméricos antisentido que son complementarios a una secuencia de ácido nucleico genómico del gen GAA que se refiere a la ubicación que comprende la posición de una mutación c.-32-13T>G (IVS1).

Los más preferidos son los compuestos oligoméricos antisentido que son complementarios a una secuencia de ácido nucleico genómico del gen GAA que se refiere a la ubicación que comprende la posición de una mutación c.-32-3C>G.

- En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden de 15 a 30 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden de 20 a 30 nucleótidos. Un experto en la técnica apreciará que esto incluye compuestos antisentido de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden de 15 a 25 nucleótidos. Un experto normal en la técnica apreciará que esto incluye compuestos antisentido de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden 20 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden 19 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden 18 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden 17 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden 16 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden 15 nucleótidos.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos incluyen secuencias de oligonucleótidos que comprenden al menos 15 nucleótidos consecutivos de uno de los compuestos antisentido como se reivindican, más preferiblemente al menos 16 nucleótidos consecutivos de uno de los compuestos antisentido como se reivindican, más preferiblemente al menos 17 nucleótidos consecutivos de uno de los compuestos antisentido como se reivindican, más preferiblemente al menos 18 nucleótidos consecutivos de uno de los compuestos antisentido como se reivindican, más preferiblemente al menos 19 nucleótidos consecutivos de uno de los compuestos antisentido como se reivindican, más preferiblemente al menos 20 nucleótidos consecutivos de uno de los compuestos antisentido como se reivindican.

Cualquier nucleótido restante de los oligonucleótidos puede ser oligonucleótidos que mejoran la resistencia a la RNasa H, secuencias dirigidas a células, secuencias de penetración celular, secuencias marcadoras o cualquier otra secuencia.

Un experto en la técnica armado con los compuestos antisentido divulgados en el presente documento podrá, sin experimentación indebida, identificar compuestos antisentido adicionales.

Para que un oligonucleótido antisentido logre el éxito terapéutico, la química del oligonucleótido debe permitir una absorción celular adecuada. Kurreck, J. (2003) Eur. J. Biochem. 270: 1628-1644). Los oligonucleótidos de empalme se compone tradicionalmente de modificaciones uniformes que hacen que el oligonucleótido sea similar al ARN y, por lo tanto, resistente a la escisión por la RNasa H, que es fundamental para lograr la modulación del empalme. En el presente documento se proporcionan compuestos antisentido para la modulación del empalme.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido son quiméricos, con regiones de química similar al ARN y similar al ADN. A pesar de las regiones de química similar al ADN, los compuestos quiméricos son preferiblemente resistentes a la RNasa H y modulan eficazmente el empalme del ARNm objetivo *in vitro* e *in vivo*. En otra realización preferida, los compuestos oligoméricos antisentido divulgados muestran una absorción celular mejorada y una mayor actividad farmacológica en comparación con los oligonucleótidos modificados uniformemente.

En el presente documento se contemplan compuestos oligoméricos antisentido que se dirigen a un sitio de empalme de un ARNm objetivo o a secuencias represoras de empalme, o secuencias potenciadoras de empalme, preferiblemente secuencias represoras de empalme. Los sitios de empalme incluyen sitios de empalme aberrantes y crípticos.

Un experto en la técnica reconoce que la inclusión de desapareamientos es posible sin eliminar la actividad del compuesto antisentido. Por lo tanto, los compuestos proporcionados en el presente documento están dirigidos a aquellos compuestos antisentido que pueden contener hasta un 10 %, lo más preferiblemente, no más del 5 % o ningún desapareamiento. Los nucleótidos restantes no interrumpen la hibridación (por ejemplo, bases universales).

Se entiende en la técnica que la incorporación de modificaciones de afinidad de nucleótidos puede permitir un mayor número de desapareamientos en comparación con un compuesto no modificado. De manera similar, ciertas secuencias de oligonucleótidos pueden ser más tolerantes a los desapareamientos que otras secuencias de oligonucleótidos. Un experto en la técnica es capaz de determinar un número apropiado de desapareamientos entre oligonucleótidos, o entre un oligonucleótido y un ácido nucleico objetivo, por ejemplo determinando la temperatura de fusión.

Los expertos saben que la hibridación con un ARNm objetivo depende de las condiciones. "Condiciones de hibridación estrictas" o "condiciones estrictas" se refieren a condiciones en las que un compuesto oligomérico hibridará con su secuencia objetivo, pero con un número mínimo de otras secuencias. Las condiciones estrictas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias, y las "condiciones estrictas" bajo las cuales los compuestos oligoméricos se hibridan con una secuencia objetivo están determinadas por la naturaleza y composición de los compuestos oligoméricos y los ensayos en los que se investigan.

Los compuestos antisentido, o una parte de los mismos, pueden tener un porcentaje definido de identidad con una SEQ ID NO, o un compuesto que tiene un número Isis específico. Como se usa en el presente documento, una secuencia es idéntica a la secuencia divulgada en el presente documento si tiene la misma capacidad de emparejamiento de nucleobases. Por ejemplo, un ARN que contiene uracilo en lugar de timidina en las secuencias divulgadas se consideraría idéntico ya que ambos se emparejan con adenina. Esta identidad puede ser a lo largo de toda la longitud del compuesto oligomérico, o en una porción del compuesto antisentido (por ejemplo, los nucleótidos 1-20 de un compuesto de 27 mer pueden compararse con uno de 20 mer para determinar el porcentaje de identidad del compuesto oligomérico con la SEQ ID NO). Los expertos en la técnica entienden que un compuesto antisentido no necesita tener una secuencia idéntica a las descritas en el presente documento para funcionar de forma similar al compuesto antisentido descrito en el presente documento. También se contemplan versiones abreviadas del compuesto antisentido enseñado en el presente documento, o versiones no idénticas del compuesto antisentido enseñado en el presente documento. Las versiones no idénticas son aquellas en las que cada base no tiene la misma actividad de emparejamiento que los compuestos antisentido divulgados en el presente documento. Las bases no tienen la misma actividad de emparejamiento por ser más cortas o tener al menos un sitio abásico. Alternativamente, una versión no idéntica puede incluir al menos una base reemplazada por una base diferente con diferente actividad de emparejamiento (por ejemplo, G puede reemplazarse por C, A o T). El porcentaje de identidad se calcula de acuerdo con el número de bases que tienen un apareamiento de bases idéntico correspondiente a la SEQ ID NO o al compuesto antisentido con el que se compara. Las bases no idénticas pueden estar adyacentes entre sí, dispersas por todo el oligonucleótido o ambas cosas.

Por ejemplo, un 16 mer que tiene la misma secuencia que los nucleótidos 2-17 de un 20 mer es 80 % idéntico al 20 mer. Alternativamente, un 20 mer que contiene cuatro nucleótidos no idénticos al 20 mer también es 80 % idéntico al 20 mer. Un 14 mer que tiene la misma secuencia que los nucleótidos 1-14 de un 18 mer es 78 % idéntico al 18 mer. Dichos cálculos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica.

El porcentaje de identidad se basa en el porcentaje de nucleótidos de la secuencia original presente en una parte de la secuencia modificada. Por lo tanto, un compuesto antisentido de 30 nucleobases que comprenda la secuencia completa del complemento de un segmento objetivo activo de 20 nucleobases tendría una porción del 100 % de identidad con el complemento del segmento objetivo activo de 20 nucleobases, mientras que además comprendería

una porción adicional de 10 nucleobases. El complemento de un segmento objetivo activo puede constituir una única porción.

Es bien sabido por los expertos en la técnica que es posible aumentar o disminuir la longitud de un compuesto antisentido y/o introducir bases de emparejamiento erróneo sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. (Proc. Natl. Acad Sci EE.UU. 89: 7305-7310, 1992), se ensayó una serie de compuestos oligoméricos antisentido de 13-25 nucleótidos de longitud para determinar su capacidad para inducir la escisión de un ARN objetivo. Los compuestos oligoméricos antisentido de 25 nucleótidos de longitud con 8 u 11 bases de emparejamiento erróneo cerca de los extremos de los compuestos oligoméricos antisentido fueron capaces de dirigir la escisión específica del ARNm objetivo, aunque en menor medida que los compuestos oligoméricos antisentido que no contenían desajustes. De manera similar, la escisión específica objetivo se logró utilizando compuestos oligoméricos antisentido de 13 nucleobases, incluidos aquellos con 1 o 3 desajustes. Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16: 3341-3358, 1988) probaron una serie de compuestos oligoméricos antisentido de 14 nucleobases en tándem, y compuestos oligoméricos antisentido de 28 y 42 nucleobases que comprende la secuencia de dos o tres de los compuestos oligoméricos antisentido en tándem, respectivamente, por su capacidad para detener la traducción de DHFR humano en un ensayo de reticulocitos de conejo. Cada uno de los tres compuestos oligoméricos antisentido de 14 nucleobases solo fue capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los compuestos oligoméricos antisentido de 28 o 42 nucleobases. Se entiende que los compuestos antisentido pueden variar en longitud y porcentaje de complementariedad con el objetivo siempre que mantengan la actividad deseada. Los métodos para determinar la actividad deseada se divulgan en este documento y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Como se sabe en la técnica, un nucleósido es una combinación de base y azúcar. La porción de base del nucleósido es normalmente una base heterocíclica (a veces denominada "nucleobase" o simplemente "base"). Las dos clases más comunes de tales bases heterocíclicas son las purinas y las pirimidinas. Los nucleótidos son nucleósidos que además incluyen un grupo fosfato unido covalentemente a la porción de azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar de pentofuranosilo, el grupo fosfato puede unirse a la fracción hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. Al formar oligonucleótidos, los grupos fosfato unen covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. Dentro de los oligonucleótidos, se suele hacer referencia a los grupos fosfato como formadores de la cadena principal entre nucleósidos del oligonucleótido. El enlace normal o cadena principal del ARN y el ADN es un enlace fosfodiéster de 3' a 5'. A menudo es preferible incluir modificaciones químicas en los oligonucleótidos para alterar su actividad. Las modificaciones químicas pueden alterar la actividad de los oligonucleótidos, por ejemplo: aumentando la afinidad de un oligonucleótido antisentido por su ARN objetivo, aumentando la resistencia a las nucleasas y/o alterando la farmacocinética del oligonucleótido. El uso de productos químicos que aumentan la afinidad de un oligonucleótido por su objetivo puede permitir el uso de compuestos de oligonucleótidos más cortos.

Los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento también pueden contener uno o más nucleósidos que tienen fracciones de azúcar modificadas. El anillo de azúcar furanosilo de un nucleósido se puede modificar de varias maneras, entre las que se incluyen, pero no se limitan a, la adición de un grupo sustituyente, el puente de dos átomos del anillo no germinales para formar un ácido nucleico bicíclico (BNA) y la sustitución de un átomo o grupo tal como -S-, -N(R)- o -C(R1)(R2) para oxígeno del anillo en la posición 4'. Las fracciones de azúcar modificadas son bien conocidas y se pueden usar para alterar, típicamente aumentar, la afinidad del compuesto antisentido por su objetivo y/o aumentar la resistencia a la nucleasa. Una lista representativa de azúcares modificados preferidos incluye, pero no se limitan a, azúcares modificados bicíclicos (BNA), incluidos LNA y ENA (puente de 4'-(CH2)2-O-2'); y azúcares sustituidos, especialmente azúcares sustituidos en 2' que tienen un grupo sustituyente 2'-F, 2'-OCH2 o un 2'-O(CH2)2-OCH3. Los azúcares también se pueden reemplazar con grupos miméticos de azúcar, entre otros. Los métodos para la preparación de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la materia. Los compuestos adecuados pueden comprender uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alquenilo; O-, S- o N-alquinilo; u O-alquil-O-alquilo, en el que el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C1 a C10 sustituido o no sustituido o alquenilo C2 a C10 y alquinilo. También son adecuados O((CH2)nO)mCH3, O(CH2)nOCH3, O(CH2)nNH2, O(CH2)nCH3, O(CH2)nONH2 y O(CH2)nON((CH2)nCH3)2, en los que n y m son de 1 hasta aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH3, OCN, Cl, Br, CN, CF3, OCF3, SOCH3, SO2CH3, ONO2, NO2, N3, NH2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH2CH2OCH3, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martín et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH2)2ON(CH3)2, también conocido como 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetil-amino-etoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-(CH2)2-O-(CH2)2-N(CH3)2. Otras modificaciones incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH3), 2'-aminopropoxi (2'-OCH2CH2CH2NH2), 2'-alilo (2'-CH2-CH-CH2), 2'-O-alilo (2'-O-CH2-CH-CH2) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arabino (arriba) o en la posición ribo (abajo). Una modificación de 2'-arabino es 2'-F. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en los oligonucleótidos enlazados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido

terminal 5'. Los compuestos antisentido también pueden tener miméticos de azúcar tales como fracciones de ciclobutilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 5,700,920; y, 6,147,200.

En un aspecto de la presente invención, los compuestos oligoméricos incluyen nucleósidos modificados para inducir una conformación de azúcar 3' endo. Un nucleósido puede incorporar modificaciones de la base heterocíclica, la fracción de azúcar o ambos para inducir una conformación de azúcar 3'-endo deseada. Estos nucleósidos modificados se utilizan para imitar los nucleósidos similares al ARN de modo que las propiedades particulares de un compuesto oligomérico puedan mejorarse mientras se mantiene la geometría conformacional 3'-endo deseable.

En la presente invención existe una preferencia por un dúplex de tipo ARN (forma de hélice A, predominantemente 3'-endo) ya que son resistentes a RNasa H. Las propiedades que se mejoran mediante el uso de nucleósidos 3'-endo más estables incluyen, pero no se limitan a: modulación de las propiedades farmacocinéticas a través de la modificación de la unión a proteínas, constante de disociación de las proteínas, absorción y eliminación; modulación de la estabilidad de la nucleasa así como de la estabilidad química; modulación de la afinidad y especificidad de unión del oligómero (afinidad y especificidad por enzimas así como por secuencias complementarias); y aumentar la eficacia de la escisión del ARN.

La conformación del nucleósido está influenciada por varios factores, incluida la sustitución en las posiciones 2', 3' o 4' del azúcar pentofuranosilo. Los sustituyentes electronegativos generalmente prefieren las posiciones axiales, mientras que los sustituyentes estéricamente exigentes generalmente prefieren las posiciones ecuatoriales (Principles of Nucleic Acid Structure, Wolfgang Sanger, 1984, Springer-Verlag). La modificación de la posición 2' para favorecer la conformación 3'-endo se puede lograr manteniendo el 2'-OH como elemento de reconocimiento (Gallo et al., Tetrahedron (2001), 57, 5707 - 5713. Harry-O'kuru et al., J. Org. Chem., (1997), 62(6), 1754-1759 y Tang et al., J. Org. Chem. (1999), 64, 747-754.) Alternativamente, la preferencia por la conformación 3'-endo se puede lograr mediante la eliminación del 2'-OH como lo ejemplifican los 2' desoxi-2'F-nucleósidos (Kawasaki et al., J. Med. Chem (1993), 36, 831-841), que adopta la conformación 3'-endo posicionando el átomo de flúor electronegativo en posición axial. Los grupos sustituyentes 2' representativos susceptibles de la presente invención que producen propiedades conformacionales de forma A (3'-endo) a los dúplex resultantes incluyen grupos sustituyentes 2'-O-alquilo, alquilo 2'-O-sustituido y grupos sustituyentes 2'-fluoro. Otros grupos sustituyentes adecuados son diversos éteres y tioéteres de alquilo y arilo, aminas y aminas sustituidas con monoalquilo y dialquilo.

Otras modificaciones del anillo de ribosa, por ejemplo, la sustitución en la posición 4' para producir nucleósidos modificados 4'-F (Guillerm et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (1995), 5, 1455-1460 y Owen et al., J. Org. Chem. (1976), 41, 3010-3017), o por ejemplo la modificación para producir análogos de nucleósidos de metanocarba (Jacobson et al., J. Med. Chem. Lett. (2000), 43, 2196-2203 y Lee et al., Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters (2001), 11, 1333-1337) también inducen la preferencia por la conformación 3'-endo. De manera similar, uno o más nucleósidos pueden modificarse de tal manera que la conformación se bloquee en una conformación de tipo C3'-endo, es decir, ácido nucleico bloqueado (LNA, Singh et al., Chem. Común. (1998), 4, 455-456) y ácidos nucleicos con puente de etileno (ENA(TM), Morita et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2002), 12, 73-76).

Las modificaciones preferidas del azúcar se seleccionan del grupo que consiste en 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-fluoro, 2'-dimetilaminooxietoxi, 2'-dimetilaminoetoxietoxi, 2'-guanidinio, 2'-O-etil guanidinio, 2'-carbamato, 2'-aminooxi, 2'-acetamido y ácido nucleico bloqueado. En una realización preferida, la modificación de azúcar es 2'-O-metilo o 2'-O-metoxietilo.

Los compuestos oligoméricos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica como base heterocíclica o simplemente como "base"). Como se usa en el presente documento, los nucleótidos "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G), y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Una "sustitución" es el reemplazo de una base natural o no modificada por otra base natural o sin modificar. Nucleótidos "modificados" significan otros nucleótidos sintéticos y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinilo (-C[idéntico a]C-CH3) uracilo y citosina y otros derivados de alquinilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8 , 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otros nucleótidos modificados incluyen pirimidinas tricíclicas tales como citidina de fenoxazina (1H-pirimido (5,4-b) (1,4) benzoxazin-2 (3H)-ona), citidina de fenotiazina (1H-pirimido (5,4-b) (1,4)benzotiazina-2(3H)-ona), abrazaderas G tales como una citidina de fenoxazina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido(5,4-b)(1,4)benzoxazina-2(3H)-ona), citidina de carbazol (2H-pirimido(4,5-b)indol-2-ona), citidina de piridoindol (H-pirido(3',2':4,5)pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Los nucleótidos modificados también pueden incluir aquellos en los que la base de purina o pirimidina se reemplaza con otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-

desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otros nucleótidos incluyen aquellos divulgados en la patente de los Estados Unidos Nº 3,687,808, aquellos divulgados en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, aquellos divulgados por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613, y aquellos divulgados por Sanghvi, Y. S., Capítulo 15, Antisense Research and Applications, páginas 289-302, Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993. Algunos de estos nucleótidos son conocidos por los expertos en la técnica como adecuados para aumentar la afinidad de unión de los compuestos de la invención. Estos incluyen pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, incluidas 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0.6-1.2 °C y son actualmente sustituciones de base adecuadas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo. Se entiende en la técnica que la modificación de la base no implica tales modificaciones químicas como para producir sustituciones en una secuencia de ácido nucleico.

Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de algunos de los nucleótidos modificados mencionados anteriormente, así como otros nucleótidos modificados, incluyen, pero no se limitan a, los mencionados anteriormente, patente de los Estados Unidos No. 3,687,808, así como también las patente de los Estados Unidos Nos. 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 5,681,941; y 5,750,692.

Los compuestos oligoméricos de la presente invención también pueden incluir compuestos heterocíclicos policíclicos en lugar de una o más de las fracciones de base heterocíclica de origen natural. Anteriormente se han informado varios compuestos heterocíclicos tricíclicos. Estos compuestos se usan habitualmente en aplicaciones antisentido para aumentar las propiedades de unión de la cadena modificada a una cadena objetivo. Las modificaciones más estudiadas están dirigidas a las guanosinas, por lo que se han denominado abrazaderas G o análogos de citidina. Los análogos de citosina representativos que forman 3 enlaces de hidrógeno con una guanosina en una segunda cadena incluyen 1,3-diazafenoxazin-2-ona (Kurchavov, et al., Nucleosides and Nucleotides, 1997, 16, 1837-1846), 1,3-diazafenotiazin-2-ona, (Lin, K.-Y.; Jones, RJ; Matteucci, MJ Am. Chem. Soc. 1995, 117, 3873-3874) y 6,7,8,9-tetrafluoro-1,3-diazafenoxazin-2-ona (Wang, J.; Lin, K.-Y., Matteucci, M. Tetrahedron Lett. 1998, 39, 8385-8388). Incorporadas en oligonucleótidos, se demostró que estas modificaciones de bases se hibridan con guanina complementaria y también se demostró que esta última se hibrida con adenina y mejora la estabilidad térmica helicoidal mediante interacciones de apilamiento extendidas (vease también las publicaciones previas a la concesión de la patente de los Estados Unidos 20030207804 y 20030175906).

Se han observado otras propiedades estabilizadoras de la hélice cuando un análogo/sustituto de citosina tiene una fracción aminoetoxi unida a la estructura rígida de 1,3-diazafenoxazin-2-ona (Lin, K.-Y.; Matteucci, M.J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532). Los estudios de unión demostraron que una única incorporación podría mejorar la afinidad de unión de un oligonucleótido modelo a su ADN o ARN objetivo complementario con una ΔTm de hasta 18 °C en relación con la citosina 5-metilo, que es una mejora de alta afinidad para una sola modificación. Por otro lado, la ganancia en estabilidad helicoidal no compromete la especificidad de los oligonucleótidos.

Otros compuestos heterocíclicos tricíclicos y métodos para usarlos que pueden usarse en la presente invención se divulgan en las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,028,183, y 6,007,992.

La afinidad de unión mejorada de los derivados de fenoxazina junto con su especificidad de secuencia no comprometida los convierte en valiosos análogos de nucleobase para el desarrollo de fármacos antisentido más potentes. De hecho, se han derivado datos prometedores de experimentos *in vitro* que demuestran que los heptanucleótidos que contienen sustituciones de fenoxazina son capaces de activar la RNasa H, mejorar la absorción celular y exhibir una mayor actividad antisentido (Lin, K-Y; Matteucci, M.J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 8531-8532). La mejora de la actividad fue aún más pronunciada en el caso de la abrazadera G, ya que se demostró que una sola sustitución mejora significativamente la potencia *in vitro* de los oligonucleótidos de 2'-desoxifosforotioato de 20 mer (Flanagan, W.M.; Lobo, J.J.; Olson, P.; Grand, D.; Lin, K.-Y.; Wagner, R.W.; Matteucci, M. Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 1999, 96, 3513-3518).

Otros compuestos heterocíclicos policíclicos modificados útiles como bases heterocíclicas se divulgan en, pero no se limitan a, las mencionadas anteriormente patente de los Estados Unidos Nº 3,687,808, así como también las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,434,257; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,646,269; 5,750,692; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; y 5,681,941, y la publicación previa a la concesión de patente de los Estados Unidos 20030158403.

Los compuestos descritos en el presente documento pueden incluir grupos de enlazamiento entre nucleósidos que enlazan los nucleósidos o bien unidades monoméricas modificadas entre sí formando de esta manera un compuesto antisentido. Las dos clases principales de grupos de enlazamiento entre nucleósidos se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces entre nucleósidos que contienen fósforo representativos incluyen, pero no se limitan a, fosfodiésteres, fosfotriésteres, metilfosfonatos, fosforamidato y fosforotioatos. Los grupos de enlace entre nucleósidos representativos que no contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, metilenmetilimino (-CH2-

N(CH3)-O-CH2-), tiodiéster (-OC(O)-S-), tionocarbamato (-OC(O)(NH)-S-); siloxano (-O-Si(H)2-O-); y N,N'-dimetilhidracina (-CH2-N(CH3)-N(CH3)-). Los enlaces entre nucleósidos modificados, en comparación con los enlaces fosfodiéster naturales, se pueden usar para alterar, típicamente aumentar, la resistencia a la nucleasa del compuesto antisentido. Los enlaces entre nucleósidos que tienen un átomo quiral se pueden preparar racémicos, quirales o como una mezcla. Los enlaces entre nucleósidos quirales representativos incluyen, pero no se limitan a, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los métodos de preparación de enlaces que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los grupos de enlazamiento entre nucleósidos modificados adecuados son, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilo y otros alquilfosfonatos que incluyen 3'-alquilenfosfonatos, 5'-alquilenfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, fosfonoacetato y tiofosfonoacetato (véase Sheehan et al., Nucleic Acids Research, 2003, 31(14), 4109-4118 y Dellinger et al., J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 940-950), selenofosfatos y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos de estos enlazados 2'-5' y aquellos que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces entre nucleótidos son enlaces 3' con 3', 5' con 5' o 2' con 2'. Los oligonucleótidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace 3' con 3' en el enlace entre nucleótidos más 3', es decir, un único residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

Se ha informado que los N3'-P5'-fosforamidatos exhiben una alta afinidad hacia una cadena de ARN complementaria y resistencia a la nucleasa (Gryaznov et al., J. Am. Chem. Soc., 1994, 116, 3143-3144). Los N3'-P5'-fosforamidatos se han estudiado con cierto éxito *in vivo* para subregular específicamente la expresión del gen c-myc (Skorski et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1997, 94, 3966-3971; y Faira et al., Nat. Biotechnol., 2001, 19, 40-44).

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los enlaces anteriores que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 y 5,625,050.

En algunas realizaciones de la invención, los compuestos oligoméricos pueden tener uno o más enlaces entre nucleósidos de fosforotioato y/o heteroátomo, en particular -CH2-NH-O-CH2-, -CH2-N(CH3)-O-CH2- (conocido como un metileno (metilimino) o cadena principal de MMI), -CH2-ON(CH3)-CH2-, -CH2-N(CH3)-N(CH3)-CH2- y -ON(CH3)-CH2-CH2- (en los que el enlace fosfodiéster nativo entre nucleótidos se representa como -OP(-O)(OH)-O-CH2-). Los enlaces entre nucleósidos de tipo MMI se divulgan en la patente de los Estados Unidos No. 5,489,677 anteriormente referenciada. Los enlaces amida entre nucleósidos se divulgan en la patente de los Estados Unidos No. 5,602,240.

Algunas cadenas principales de oligonucleótidos que no incluyen un átomo de fósforo tienen cadenas principales formadas por enlaces entre nucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces entre nucleósidos de alquilo o cicloalquilo y heteroátomos mixtos, o uno o más enlaces entre nucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de riboacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenimino y metilenhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen componentes mixtos de N, O, S y CH2.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 y 5,677,439.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, el enlace entre nucleósidos es fosforotioato o fosforodiamidato.

Además, se pretende que se puedan realizar múltiples modificaciones a uno o más de los compuestos oligoméricos de la invención en múltiples sitios de una o más subunidades monoméricas (son adecuados los nucleósidos) y/o enlaces entre nucleósidos para mejorar propiedades tales como, pero no se limitan a, la actividad en una aplicación seleccionada.

La síntesis de numerosos nucleósidos modificados susceptibles de la presente invención se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, Chemistry of Nucleosides and Nucleotides Vol 1-3, ed. Leroy B. Townsend, 1988, Plenum Press). La conformación de los nucleósidos modificados y sus oligómeros puede estimarse mediante varios métodos rutinarios para los expertos en la técnica, como cálculos de dinámica molecular, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y mediciones de CD.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos de la presente invención son fosforotioatos de morfolino o morfolino de fosforodiamidato.

Otro grupo de compuestos oligoméricos incluye miméticos de oligonucleótidos. Como se usa en el presente documento, el término "mimético" se refiere a grupos que están sustituidos por un azúcar, una nucleobase y/o un enlace entre nucleósidos. En general, se usa un mimético en lugar del azúcar o la combinación de enlace entre nucleósidos del azúcar, y la nucleobase se mantiene para la hibridación con un objetivo seleccionado. Los ejemplos representativos de un mimético de azúcar incluyen, pero no se limitan a, ciclohexenilo o morfolino. Los ejemplos representativos de un mimético para una combinación de enlace entre nucleósidos de azúcar incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos peptídicos (PNA) y grupos morfolino unidos por enlaces aquirales sin carga. En algunos casos se utiliza un mimético en lugar de la nucleobase. Los miméticos de nucleobase representativos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, análogos de fenoxazina tricíclicos y bases universales (Berger et al., Nuc Acid Res. 2000, 28: 2911-14).

Los métodos de síntesis de miméticos de azúcar, nucleósido y nucleobase son bien conocidos por los expertos en la técnica. La fracción de base heterocíclica o una fracción de base heterocíclica modificada se mantiene preferiblemente para la hibridación con un ácido nucleico objetivo apropiado.

Los compuestos descritos en este documento pueden contener uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, dar lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisómeras que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), [alpha] o [beta], o como (D) o (L) tal como para aminoácidos et al. La presente divulgación pretende incluir todos los posibles isómeros, así como sus formas racémicas y ópticamente puras.

Uno de estos compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótidos que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico peptídico (PNA) (Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500). Los PNA tienen propiedades de hibridación favorables, alta estabilidad biológica y son moléculas electrostáticamente neutras. Los compuestos de PNA se han utilizado para corregir empalmes aberrantes en un modelo de ratón transgénico (Sazani et al., Nat. Biotechnol, 2002, 20, 1228-1233). En los compuestos oligoméricos de PNA, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Los nucleótidos están unidos directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de compuestos oligoméricos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Los compuestos de PNA se pueden obtener comercialmente de Applied Biosystems (Foster City, California, EE. UU.). En la técnica se conocen numerosas modificaciones de la cadena principal básica de PNA; particularmente útiles son los compuestos de PNA con uno o más aminoácidos conjugados a uno o ambos extremos. Por ejemplo, 1-8 residuos de lisina o arginina son útiles cuando se conjugan con el extremo de una molécula de PNA. Una cola de poliarginina puede ser adecuada para mejorar la penetración celular.

Otra clase de miméticos de oligonucleótidos que se ha estudiado se basa en unidades de morfolino unidas (ácido nucleico de morfolino) que tienen bases heterocíclicas unidas al anillo de morfolino. Se han informado varios grupos de unión que unen las unidades monoméricas de morfolino en un ácido nucleico de morfolino. Se ha seleccionado una clase de grupos de unión para dar un compuesto oligomérico no iónico. Los compuestos oligoméricos a base de morfolino son miméticos no iónicos de oligonucleótidos que tienen menos probabilidades de formar interacciones no deseadas con proteínas celulares. Dwaine A. Braasch y David R. Corey, Biochemistry, 2002, 41(14), 4503-4510). Los compuestos oligoméricos a base de morfolino se han estudiado en embriones de pez cebra (véase: Génesis, volumen 30, número 3, 2001 y Heasman, J., Dev. Biol., 2002, 243, 209-214). También se han informado estudios adicionales de compuestos oligoméricos a base de morfolino (Nasevicius et al., Nat. Genet., 2000, 26, 216-220; y Lacerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 9591-9596). Los compuestos oligoméricos basados en morfolino se divulgan en la Patente de los Estados Unidos No. 5,034,506. La clase de morfolino de compuestos oligoméricos se ha preparado con una variedad de diferentes grupos de enlace que se unen a las subunidades monoméricas. Los grupos de enlace pueden variar de quirales a aquirales y de cargados a neutros. La patente de los Estados Unidos No. 5,166,315 divulga enlaces que incluyen -OP(-O)(N(CH3)2)-O-; la patente de los Estados Unidos No. 5,034,506 divulga enlaces intermorfolino aquirales; y la patente de los Estados Unidos No. 5,185,444 divulga enlaces intermorfolino quirales que contienen fósforo.

Una clase adicional de miméticos de oligonucleótidos se denomina como ácidos nucleicos de ciclohexeno (CeNA). En los oligonucleótidos de CeNA, el anillo de furanosa normalmente presente en una molécula de ADN o ARN se reemplaza por un anillo de ciclohexenilo. Los monómeros de fosforamidita protegidos con DMT de CeNA se han preparado y utilizado para la síntesis de compuestos oligoméricos siguiendo la química clásica de fosforamidita. Se han preparado y estudiado compuestos oligoméricos de CeNA completamente modificados y oligonucleótidos que tienen posiciones específicas modificadas con CeNA (Wang et al., J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602). En general, la incorporación de monómeros de CeNA en una cadena de ADN aumenta la estabilidad de un híbrido de ADN/ARN. Los oligoadenilatos de CeNA formaron complejos con complementos de ARN y ADN con una estabilidad similar a la de los complejos nativos. El estudio de la incorporación de estructuras de CeNA en estructuras de ácidos nucleicos naturales se demostró mediante RMN y dicroísmo circular para proceder con una fácil adaptación conformacional. Además, la incorporación de CeNA en una secuencia dirigida al ARN fue estable al suero y capaz de activar la RNasa H de *E. coli*, lo que dio como resultado la escisión de la cadena de ARN objetivo.

Una modificación adicional incluye fracciones de azúcar bicíclicos como los "ácidos nucleicos bloqueados" (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo del anillo de azúcar ribosilo está unido al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar formando así un enlace 2'-C, 4'-C-oximetileno para formar la fracción de azúcar bicíclico (revisado en Elayadi et al., Curr. Opinion. Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol., 2001, 8 1-7; y Orum et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; véase también las patentes de los Estados Unidos números 6,268,490 y 6,670,461). El enlace puede ser un grupo metileno (-CH2-) que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', para lo cual se usa el término LNA para la fracción bicíclico; en el caso de un grupo etileno en esta posición, se utiliza el término ENA(TM) (Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; ENA(TM): Morita et al., Bioorganic Medicinal Chemistry, 2003, 11, 2211-2226). LNA y otros análogos de azúcares bicíclicos muestran estabilidades térmicas dúplex muy altas con ADN y ARN complementarios (Tm = +3 a +10 °C), estabilidad frente a la degradación exonucleolítica 3' y buenas propiedades de solubilidad. Los LNA están disponibles comercialmente a través de ProLigo (París, Francia y Boulder, Colo., EE. UU.).

Un isómero de LNA que también se ha estudiado es alfa-L-LNA, que ha demostrado tener una estabilidad superior frente a una exonucleasa 3'. Los alfa-L-LNA se incorporaron en gapmeros y quimeras antisentido que mostraron una potente actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372).

Otra fracción de azúcar bicíclico similar que se ha preparado y estudiado tiene el puente que va desde el grupo 3'-hidroxilo a través de un solo grupo metileno al átomo de carbono 4' del anillo de azúcar formando así un enlace 3'-C,4'-C-oximetileno (véase la patente de los Estados Unidos No. 6,043,060).

Se ha demostrado que LNA forma dúplex LNA:LNA extremadamente estables (Koshkin et al., J. Am. Chem. Soc., 1998, 120, 13252-13253). Se demostró que la hibridación LNA:LNA es el sistema dúplex de tipo de ácido nucleico más estable térmicamente, y el carácter de LNA que imita al ARN se estableció al nivel del dúplex. La introducción de 3 monómeros de LNA (T o A) aumentó significativamente los puntos de fusión (Tm = +15/+11 °C) hacia los complementos de ADN. La universalidad de la hibridación mediada por LNA ha sido enfatizada por la formación de dúplex LNA:LNA sumamente estables. La imitación de ARN de LNA se reflejó con respecto a la restricción conformacional de tipo N de los monómeros y a la estructura secundaria del dúplex LNA:ARN.

Los LNA también forman dúplex con ADN, ARN o LNA complementarios con altas afinidades térmicas. Los espectros de dicroísmo circular (CD) muestran que los dúplex que involucran LNA completamente modificado (esp. LNA:ARN) se asemejan estructuralmente a un dúplex ARN:ARN en forma de A. El examen por resonancia magnética nuclear (RMN) de un dúplex LNA:ADN confirmó la conformación 3'-endo de un monómero de LNA. También se ha demostrado el reconocimiento de ADN de doble cadena, lo que sugiere invasión de cadena por parte de LNA. Los estudios de secuencias no coincidentes muestran que los LNA obedecen las reglas de emparejamiento de bases de Watson-Crick con una selectividad generalmente mejorada en comparación con las cadenas de referencia no modificadas correspondientes. Se ha demostrado que las quimeras de ADN-LNA inhiben eficazmente la expresión génica cuando se refieren a una variedad de regiones (región 5' no traducida, región del codón de inicio o región codificante) dentro del ARNm de luciferasa (Braasch et al., Nucleic Acids Research, 2002, 30, 5160-5167).

Se han descrito oligonucleótidos antisentido potentes y no tóxicos que contienen LNA (Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 2000, 97, 5633-5638). Los autores han demostrado que los LNA confieren varias propiedades deseadas. Los copolímeros de LNA/DNA no se degradaron fácilmente en suero sanguíneo y extractos celulares. Los copolímeros de LNA/DNA exhibieron una potente actividad antisentido en sistemas de ensayo tan dispares como la señalización del receptor acoplado a proteína G en cerebro de rata viva y la detección de genes indicadores en *Escherichia coli*. También se ha logrado el suministro eficaz de LNA mediado por lipofectina en células vivas de cáncer de mama humano. Otros estudios *in vivo* exitosos que involucran LNA han demostrado la eliminación del receptor opioide delta de rata sin toxicidad. (Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 5633-5638) y en otro estudio mostró un bloqueo de la traducción de la subunidad grande de la ARN polimerasa II (Fluiter et al., Nucleic Acids Res., 2003, 31, 953-962).

Se ha descrito la síntesis y preparación de los monómeros de LNA adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con sus propiedades de oligomerización y reconocimiento de ácidos nucleicos. (Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). Los LNA y la preparación de los mismos también se describen en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

También se han preparado análogos de LNA, fosforotioato-LNA y 2'-tio-LNA (Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222). También se ha descrito la preparación de análogos de nucleósidos bloqueados que contienen dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para las polimerasas de ácidos nucleicos. (Wengel et al., WO 99/14226). Además, se ha descrito en la técnica la síntesis de 2'-amino-LNA, un nuevo análogo de oligonucleótido de alta afinidad restringido conformacionalmente (Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'-amino- y 2'-metilamino-LNA y se ha informado previamente sobre la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas complementarias de ARN y ADN.

Otro mimético de oligonucleótidos que se ha preparado y estudiado es el ácido nucleico treosa. Este mimético de oligonucleótidos se basa en nucleósidos de treosa en lugar de nucleósidos de ribosa. El interés inicial en el ácido nucleico (3',2')-alfa-L-treosa (TNA) se dirigió a la cuestión de si existía una ADN polimerasa que copiaría el TNA. Se encontró que ciertas ADN polimerasas pueden copiar tramos limitados de una plantilla de TNA (informado en Chemical

and Engineering News, 2003, 81, 9). En otro estudio se determinó que el TNA es capaz de emparejar bases antiparalelas de Watson-Crick con oligonucleótidos complementarios de ADN, ARN y TNA (Chaput et al., J. Am. Chem. Soc., 2003, 125, 856-857).

En un estudio, se preparó ácido nucleico (3',2')-alfa-L-treosa y se comparó con los análogos de amidato 2' y 3' (Wu et al., Organic Letters, 2002, 4(8), 1279-1282). Se demostró que los análogos de amidato se unen al ARN y al ADN con una fuerza comparable a la del ARN/ADN.

Se han preparado miméticos de oligonucleótidos adicionales para incluir análogos de nucleósidos bicíclicos y tricíclicos (véase Steffens et al., Helv. Chim. Acta, 1997, 80, 2426-2439; Steffens et al., J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 3249-3255; Renneberg et al., J. Am. Chem. Soc., 2002, 124, 5993-6002; y Renneberg et al., Nucleic acids res., 2002, 30, 2751-2757). Estos análogos de nucleósidos modificados se han oligomerizado utilizando el enfoque de fosforamidita y los compuestos oligoméricos resultantes que contienen análogos de nucleósidos tricíclicos han mostrado mayor estabilidad térmica (Tm) cuando se hibridan con ADN, ARN y con ellos mismos. Los compuestos oligoméricos que contienen análogos de nucleósidos bicíclicos han mostrado estabilidades térmicas cercanas a las de los dúplex de ADN.

Otra clase de miméticos de oligonucleótidos se denomina ácidos nucleicos de fosfonomonoéster que incorporan un grupo de fósforo en la cadena principal. Se informa que esta clase de miméticos de oligonucleótidos tiene propiedades físicas, biológicas y farmacológicas útiles en las áreas de inhibición de la expresión génica (oligonucleótidos antisentido, oligonucleótidos sentido y oligonucleótidos formadores de tríplex), como sondas para la detección de ácidos nucleicos y como auxiliares para su uso en Biología Molecular. Se han preparado miméticos de oligonucleótidos adicionales susceptibles de la presente invención en los que un anillo de ciclobutilo reemplaza al anillo de furanosilo de origen natural.

Otra modificación de los compuestos oligoméricos de la invención implica unir químicamente al compuesto oligomérico una o más fracciones o conjugados que mejoran las propiedades del compuesto oligomérico, como para mejorar la actividad, la distribución celular o la absorción celular del compuesto oligomérico. Estas fracciones o conjugados pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, ácido fólico, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que mejoran las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción, mejoran la resistencia a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con el ácido nucleico objetivo. Los grupos que mejoran las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que mejoran la absorción, distribución, metabolismo o excreción de los compuestos de la presente invención. Los grupos conjugados representativos se divulgan en la solicitud internacional de patente PCT/US92/09196, presentada el 23 de octubre de 1992, y las patentes de los Estados Unidos Nos. 6,287,860 y 6,762,169.

Las fracciones conjugadas incluyen, pero no se limitan a, fracciones lipídicas, tales como una fracción de colesterol, ácido cólico, un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol, un tiocolesterol, una cadena alifática, por ejemplo, residuos dodecanodiol o de undecilo, un fosfolípido, por ejemplo, di -hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, o ácido acético adamantano, una fracción de palmitilo o una fracción de octadecilamina o una fracción de hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los compuestos oligoméricos de la invención también se pueden conjugar con fármacos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, una sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la patente de los Estados Unidos No. 6,656,730.

Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de tales conjugados de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

Los compuestos oligoméricos también se pueden modificar para que tengan uno o más grupos estabilizadores que generalmente se unen a uno o ambos extremos de un compuesto oligomérico para mejorar propiedades tales como, por ejemplo, la estabilidad de la nucleasa. Incluidos en los grupos estabilizadores están las estructuras de protección. Por "estructura de protección o fracción de protección terminal" se entiende modificaciones químicas que se han incorporado en cualquiera de los extremos de los oligonucleótidos (véase, por ejemplo, Wincott y otros, documento WO 97/26270). Estas modificaciones terminales protegen a los compuestos oligoméricos que tienen moléculas de

ácido nucleico terminales de la degradación por exonucleasa y pueden mejorar el suministro y/o la localización dentro de una célula. La protección puede estar presente en el extremo 5' (protección de 5') o en el extremo 3' (protección de 3') o puede estar presente en ambos extremos de una sola cadena, o en uno o más extremos de ambas cadenas de un compuesto de doble cadena. Esta estructura de protección no debe confundirse con la "protección de 5'" metilguanosina invertida presente en el extremo 5' de las moléculas de ARNm nativo. En ejemplos no limitantes, la protección de 5' incluye un residuo abásico invertido (fracción), nucleótido 4',5'-metileno; el nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosilo), el nucleótido 4'-tio, el nucleótido carbocíclico; el nucleótido de 1,5-anhidrohexitol; L-nucleótidos; alfa-nucleótidos; nucleótido base modificado; enlace fosforoditioato; el nucleótido de treo-pentofuranosilo; el nucleótido 3',4'-seco acíclico; nucleótido 3,4-dihidroxibutilo acíclico; el nucleótido 3,5-dihidroxipentil acíclico, la fracción de nucleótido invertida 3'-3'; la fracción abásica invertida 3'-3'; la fracción de nucleótido invertida 3'-2'; la fracción abásica invertida 3'-2'; fosfato de 1,4-butanodiol; 3'-fosforamidato; hexilfosfato; fosfato de aminohexilo; 3'-fosfato; 3'-fosforotioato; fosforoditioato; o fracción de metilfosfonato que forma puente o no forma puente (para más detalles véase Wincott et al., publicación internacional PCT No. WO 97/26270).

Las estructuras de protección en 3' particularmente adecuadas incluyen, por ejemplo, nucleótido de 4',5'-metileno; el nucleótido 1-(beta-D-eritrofuranosilo); 4'-tionucleótido, nucleótido carbocíclico; fosfato de 5'-amino-alquilo; fosfato de 1,3-diamino-2-propilo, fosfato de 3-aminopropilo; fosfato de 6-aminohexilo; fosfato de 1,2-aminododecilo; fosfato de hidroxipropilo; nucleótido 1,5-anhidrohexitol; L-nucleótido; alfa-nucleótido; nucleótido base modificado; fosforoditioato; nucleótido treo-pentofuranosilo; nucleótido 3',4'-seco acíclico; nucleótido 3,4-dihidroxibutilo; nucleótido 3,5-dihidroxipentilo, fracción de nucleótido invertida 5'-5'; fracción abásica invertida 5'-5'; 5'-fosforamidato; 5'-fosforotioato; fosfato de 1,4-butanodiol; 5'-amino; 5'-fosforamidato, puente y o no puente, fosforotioato y/o fosforoditioato, metilfosfonato puente o no puente y fracciones 5'-mercapto (para más detalles, véase Beaucage y Tyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925).

Otros grupos estabilizantes de 3' y 5' que se pueden usar para proteger uno o ambos extremos de un compuesto oligomérico para impartir estabilidad a la nucleasa incluyen aquellos divulgados en el documento WO 03/004602 publicado el 16 de enero de 2003.

En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos pueden conjugarse con una amplia variedad de diferentes polímeros cargados positivamente. Los ejemplos de polímeros cargados positivamente incluyen péptidos, tales como los péptidos ricos en arginina (Ejemplos de péptidos cargados positivamente que pueden usarse en la práctica de la invención incluyen R9F2C; (RXR)4 XB (en el que X puede ser cualquier aminoácido); R5F2R4c; (RFF)3; proteínas Tat, tales como la secuencia TAT CYGRKKRRQRRR; y (RFF)3R), polímeros catiónicos, tales como el polímero dendrimérico de octaguanindina y otras moléculas cargadas positivamente como se conoce en la técnica para la conjugación con compuestos de oligonucleótidos antisentido. En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los oligonucleótidos antisentido se conjugan con un polímero cargado positivamente que comprende un polímero que tiene un peso molecular que es de aproximadamente 1,000 a 20,000 Dalton, y preferiblemente de aproximadamente 5,000 a 10,000 Dalton. Otro ejemplo de polímeros cargados positivamente es la polietilenimina (PEI) con múltiples grupos amino cargados positivamente en sus cadenas ramificadas o no ramificadas. La PEI también se ha utilizado ampliamente como vesícula de administración de genes y oligómeros.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos se modifican con secuencias de penetración celular. Las secuencias de penetración celular adecuadas incluyen péptidos de penetración celular, tales como péptido TAT, MPG, Pep-1, MAP, fusogénico, péptidos antimicrobianos (AMP), péptidos bactericidas, péptidos fungicidas, péptidos virucidas.

Los péptidos de penetración celular (CPP) son péptidos cortos que facilitan la absorción celular de las partículas de la invención. La partícula de la invención está asociada con los péptidos CPP ya sea a través de un enlace químico a través de enlaces covalentes o a través de interacciones no covalentes. La función de los CPP es suministrar las partículas en las células, un proceso que comúnmente ocurre a través de la endocitosis con la carga suministrada a los endosomas de las células vivas de los mamíferos. Los CPP suelen tener una composición de aminoácidos que contiene una gran abundancia relativa de aminoácidos cargados positivamente, tales como lisina o arginina, o tiene secuencias que contienen un patrón alternante de aminoácidos polares/cargados y aminoácidos hidrofóbicos no polares. Estos dos tipos de estructuras se denominan policatiónicas o anfipáticas, respectivamente. Una tercera clase de CPP son los péptidos hidrófobos, que contienen solo residuos apolares, con carga neta baja o tienen grupos de aminoácidos hidrófobos que son cruciales para la absorción celular.

Un ejemplo de péptido de penetración celular es el activador transcripcional de activación trans (Tat) del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1) que podría ser absorbido eficientemente del medio circundante por numerosos tipos de células en cultivo. Otros péptidos de penetración celular son MPG, Pep-1, transportano, penetratina, CADY, TP, TP10, octámero de arginina, secuencias de poliarginina, Arg8, proteína estructural VP22 HSV-1, motivos ricos en prolina SAP, péptidos Vectocell®, hCT (9-32), SynB, Pvec y PPTG1. Los péptidos que penetran en las células pueden ser catiónicos, que contienen esencialmente grupos de poliarginina en su secuencia primaria o anfipáticos. Los CPP son generalmente péptidos de menos de 30 aminoácidos, derivados de proteínas naturales o no naturales o secuencias quiméricas.

En realizaciones adecuadas, los compuestos oligoméricos se incorporan o bien se asocian con nanopartículas. Las nanopartículas pueden modificarse adecuadamente para dirigirse a células específicas y optimizarse para penetrar en las células. Un experto en la materia conoce métodos para emplear nanopartículas para el suministro de compuestos oligoméricos a las células.

En realizaciones adecuadas de la presente invención, los compuestos oligoméricos se modifican con una fracción de agente de escape endosomal. La vía endocítica es un importante mecanismo de absorción de las células. Los compuestos absorbidos por la vía endocítica quedan atrapados en los endosomas y pueden ser degradados por enzimas específicas en el lisosoma. Esto puede ser deseado o no deseado dependiendo del propósito. Si no se desea que los endosomas lo absorban, se puede usar un agente de escape endosómico. Los agentes de escape endosómicos adecuados pueden ser cloroquina, péptido TAT.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto oligomérico dado se modifiquen uniformemente y, de hecho, se puede incorporar más de una de las modificaciones antes mencionadas en un solo compuesto o incluso dentro de un solo nucleósido dentro de un compuesto oligomérico.

La presente invención también incluye compuestos oligoméricos que son compuestos quiméricos. Los compuestos oligoméricos "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos oligoméricos de cadena sencilla o doble, tales como los oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una de las cuales comprende al menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleotídico. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos son una forma de compuesto oligomérico. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región que se modifica para conferir al oligonucleótido mayor resistencia a la degradación por nucleasas, mayor absorción celular, alteración de la carga, mayor estabilidad y/o mayor afinidad de unión por el ácido nucleico objetivo.

Los compuestos oligoméricos quiméricos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos, miméticos de oligonucleótidos o regiones o porciones de los mismos. Dichos compuestos también se han denominado en la técnica híbridos o gapmeros. Las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

La oligomerización de nucleósidos modificados y no modificados se puede realizar de forma rutinaria de acuerdo con los procedimientos de la literatura para el ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait et al., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo et al., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713).

Los compuestos oligoméricos de la presente invención pueden prepararse conveniente y rutinariamente a través de la conocida técnica de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es vendido por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, California). Cualquier otro medio para tal síntesis conocido en la técnica puede emplearse adicional o alternativamente. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

Los siguientes compuestos precursores, incluidas las amiditas y sus compuestos intermedios, se pueden preparar mediante métodos habituales para los expertos en la técnica; compuesto intermedio 5'-O-Dimetoxitritil-timidina para amidita 5-metil dC, compuesto intermedio 5'-O-dimetoxitritil-2'-desoxi-5-metilcitidina para amidita 5-metil-dC, compuesto intermedio penúltimo 5'-O-Dimetoxitritil-2'-desoxi-N4-benzoil-5-metilcitidina para amidita 5-metil dC, (5'-O-(4,4'-dimetoxitrifenilmetil)-2'-desoxi-N4-benzoil-5-metilcitidin-3'-O-il)-2-cianoetil-N,N-diisopropil-fosforamidita (amidita 5-metil dC), 2'-fluorodesoxiadenosina, 2'-fluorodesoxiguanosina, 2'-fluorouridina, 2'-fluorodesoxicitidina, amiditas 2'-O-(2-metoxietilo) modificadas, compuesto intermedio 2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, compuesto intermedio penúltimo 5'-O-DMT-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridina, (5'-O-(4,4'-dimetoxi-trifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-5-metiluridin-3'-O-il)-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita MOE T), compuesto intermedio 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-5-metilcitidina, compuesto intermedio penúltimo 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2-metoxietil)-N<4>-benzoil-5-metilcitidina, (5'-O-(4,4'-Dimetoxitrifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N<4>-benzoil-5-metilcitidin-3'-O-il)-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita MOE 5-Me-C), (5'-O-(4,4'-dimetoxi-trifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N<6>-benzoiladenosin-3'-O-il)-2-cianoetil-N,N-diisopropilfosforamidita (amidita MOE A), (5'-O-(4,4'-dimetoxitrifenilmetil)-2'-O-(2-metoxietil)-N<4>-isobutirilguanosin-3'-O-il)-2-cianoetil-N,N-diisopropil fosforamidita (amidita MOE G), amiditas del nucleósido de 2'-O-(aminooxietilo) y amiditas del nucleósido 2'-O-(dimetilaminooxietilo), amiditas del nucleósido 2'-(dimetilaminooxietoxi), 5'-O-terc-butildifenilsilil-O<2>-2'-anhidro-5-metiluridina, 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-(2-hidroxietil)-5-metiluridina, 2'-O-((2-ftalimidoxi)etil)-5'-t-butildifenilsilil-5-metiluridina,5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-((2-formadoximinooxi)etil)-5-metil uridina , 5'-O-terc-butildifenilsilil-2'-O-(N,N dimetilaminooxietilo)-5-metiluridina, 2'-O-(dimetilaminooxietil)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(dimetilaminooxietilo)-5-metiluridina, 5'-O-DMT-2'-O-(2-N,N-dimetilaminooxietilo)-5-metiluridina-3'-((2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita), amiditas del nucleósido 2'-(aminooxietoxi), N2-isobutiril-6-O-difenil carbamoil-2'-O-(2-etilacetil)-5'-O-(4,4'-dimetoxitritil)guanosina-3'-((2-cianoetil)-N,N-diisopropilfosforamidita), amiditas del nucleósido 2'-dimetilamino etoxietoxi (2'-DMAEOE), 2'-O-(2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)etil)-5-metiluridina, 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-(2(2-N,N-dimetilaminoetoxi)-etil))-5-metiluridina y 5'-O-Dimetoxitritil-2'-O-(2(2-N,N-dimetilamino etoxi)-etil))- 5-metiluridina-3'-O-(cianoetil-N,N-diisopropil)fosforamidita.

La preparación de dichos compuestos precursores para la síntesis de oligonucleótidos es rutinaria en la técnica y se divulgan en la patente de los Estados Unidos No. 6,426,220 y la PCT WO 02/36743 publicada.

Las fosforamiditas de 2'-desoxi y 2'-metoxi beta-cianoetildiisopropilo pueden adquirirse de fuentes comerciales (por ejemplo, Chemgenes, Needham, Mass o Glen Research, Inc. Sterling, Va.). Se pueden preparar otras amiditas del nucleósido sustituido con 2'-O-alcoxi como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,506,351.

Los oligonucleótidos que contienen nucleótidos 5-metil-2'-desoxicitidina (5-Me-C) se pueden sintetizar de forma rutinaria de acuerdo con los métodos publicados (Sanghvi, et. al., Nucleic Acids Research, 1993, 21, 3197-3203) usando fosforamiditas disponibles comercialmente (Glen Research, Sterling Va. o ChemGenes, Needham, MA).

Los oligonucleótidos 2'-fluoro se pueden sintetizar de forma rutinaria como se describe (Kawasaki, et. al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831-841) y la patente de los Estados Unidos No. 5,670,633.

Las amiditas del nucleósido sustituido con 2'-O-metoxietilo se pueden preparar de forma rutinaria de acuerdo con los métodos de Martín, P., Helvetica Chimica Acta, 1995, 78, 486-504.

Las amiditas de aminooxietilo y dimetilaminooxietilo se pueden preparar de forma rutinaria de acuerdo con los métodos de la patente de los Estados Unidos No. 6,127,533.

Los oligonucleótidos que contienen fosforotioato (P-S) se pueden sintetizar mediante métodos de rutina para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press). Los oligonucleótidos de fosfinato se pueden preparar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,508,270.

Los oligonucleótidos de fosfonato de alquilo se pueden preparar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4,469,863.

Los oligonucleótidos de fosfonato de 3'-desoxi-3'-metileno se pueden preparar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,610,289 o 5,625,050.

Los oligonucleótidos de fosforamidita se pueden preparar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,256,775 o la patente de los Estados Unidos No. 5,366,878.

Los oligonucleótidos de fosfonotioato de alquilo se pueden preparar como se describe en las solicitudes PCT publicadas PCT/US94/00902 y PCT/US93/06976 (publicadas como WO 94/17093 y WO 94/02499, respectivamente).

Los oligonucleótidos de fosforamidato de 3'-desoxi-3'-amino se pueden preparar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,476,925.

Los oligonucleótidos de fosfotriéster se pueden preparar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,023,243.

Los oligonucleótidos de fosfato de borano se pueden preparar como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,130,302 y 5,177,198.

Los oligonucleótidos que contienen 4'-tio se pueden sintetizar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,639,873.

Los oligonucleósidos enlazados a metilenmetilimino, también identificados como oligonucleósidos enlazados a MMI, oligonucleósidos enlazados a metilendimetilhidrazo, también identificados como oligonucleósidos enlazados a MDH, y oligonucleósidos enlazados a metilencarbonilamino, también identificados como oligonucleósidos enlazados a amida-3, y oligonucleósidos enlazados a metilenaminocarbonilo, también identificados como oligonucleósidos enlazados a amida-4, así como compuestos de cadena principal mixta que tienen, por ejemplo, enlaces MMI y P-O o P-S alternantes que se pueden preparar como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,378,825; 5,386,023; 5,489,677; 5,602,240 y 5,610,289.

Los oligonucleósidos enlazados a formacetal y tioformacetal se pueden preparar como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5,264,562 y 5,264,564.

Los oligonucleósidos enlazados a óxido de etileno se pueden preparar como se describe en la patente de los Estados Unidos No. 5,223,618.

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) se pueden preparar de acuerdo con cualquiera de los diversos procedimientos mencionados en Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 1996, 4, 5-23. También pueden prepararse de acuerdo con las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,700,922; 5,719,262; 6,559,279 y 6,762,281.

Compuestos oligoméricos que incorporan al menos un nucleósido protegido en 2'-O mediante métodos habituales en la técnica. Después de la incorporación y la desprotección apropiada, el nucleósido protegido en 2'-O se convertirá en un ribonucleósido en la posición de incorporación. El número y la posición de las unidades de 2-ribonucleósido en el compuesto oligomérico final puede variar de uno en cualquier sitio o la estrategia puede usarse para preparar hasta un compuesto oligomérico modificado con 2'-OH completo.

Las principales estrategias de síntesis de ARN que se utilizan comercialmente en la actualidad incluyen 5'-[beta]-DMT-2'-Ot-butildimetilsililo (TBDMS), 5'-O-DMT-2'-[1(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo] (FPMP), 2'-O-[(triisopropilsilil) oxi]metilo (2'-O-CH2-O-Si(iPr)3 (TOM), y el 5'-O-silil éter-2'-ACE (5'-O-bis(trimetilsiloxi)ciclododeciloxisilil éter (DOD)-2'-O-bis(2-acetoxietoxi)metilo (ACE). Algunas empresas que actualmente ofrecen productos de ARN incluyen Pierce Nucleic Acid Technologies (Milwaukee, Wis.), Dharmacon Research Inc. (una subsidiaria de Fisher Scientific, Lafayette, Colo.) e Integrated DNA Technologies, Inc. (Coralville, Iowa). Una compañía, Princeton Separations, comercializa un activador de síntesis de ARN ofrecido para reducir los tiempos de acoplamiento, especialmente con las químicas TOM y TBDMS. Dicho activador también sería adecuado para los compuestos oligoméricos de la presente invención.

Todas las estrategias de síntesis de ARN mencionadas anteriormente son susceptibles de los compuestos oligoméricos de la presente invención. Estrategias que serían un híbrido de las anteriores, por ejemplo también se contempla en el presente documento el uso de un grupo protector de 5' de una estrategia con un grupo protector de 2'-O de otra estrategia.

Los oligonucleótidos quiméricos, los oligonucleósidos quiméricos y los oligonucleótidos/oligonucleósidos quiméricos mixtos se pueden sintetizar de acuerdo con la patente de los Estados Unidos No. 5,623,065.

Los compuestos oligoméricos quiméricos que exhiben una absorción celular mejorada y una mayor actividad farmacológica se pueden preparar de acuerdo con la patente de los Estados Unidos No. 8,501,703.

Otra forma de compuestos oligoméricos comprende oligonucleótidos antisentido triciclo-ADN (tc-ADN). Los nucleótidos de triciclo-ADN son nucleótidos modificados mediante la introducción de un anillo de ciclopropano para restringir la flexibilidad conformacional de la cadena principal y optimizar la geometría de la cadena principal del ángulo de torsión Y. Los tc-ADN homobásicos que contienen adenina y timina forman pares de bases AT extraordinariamente estables con ARN complementarios. Son adecuados los compuestos oligoméricos antisentido que contienen entre 6 y 22 triciclonucleótidos de longitud, en particular entre 8 y 20 triciclonucleótidos, más particularmente entre 10 y 18 o entre 11 y 18 triciclonucleótidos. Vease por ejemplo el documento WO2010115993 para ejemplos de oligonucleótidos antisentido triciclo-ADN (tc-ADN).

La oligomerización de nucleósidos modificados y no modificados se puede realizar de forma rutinaria de acuerdo con los procedimientos de la literatura para el ADN (Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Ed. Agrawal (1993), Humana Press) y/o ARN (Scaringe, Methods (2001), 23, 206-217. Gait et al., Applications of Chemically synthesized RNA in RNA: Protein Interactions, Ed. Smith (1998), 1-36. Gallo et al., Tetrahedron (2001), 57, 5707-5713).

Los compuestos antisentido pueden prepararse conveniente y rutinariamente a través de la conocida técnica de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es vendido por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, California). Cualquier otro medio para tal síntesis conocido en la técnica puede emplearse adicional o alternativamente. Es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. La divulgación no está limitada por el método de síntesis de compuestos antisentido.

Los métodos de purificación y análisis de oligonucleótidos son conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de análisis incluyen la electroforesis capilar (CE) y la espectroscopia de masas por electroaspersión. Dichos métodos de síntesis y análisis se pueden realizar en placas de múltiples pocillos. Los métodos descritos en este documento no están limitados por el método de purificación de oligómeros.

En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido proporcionados en el presente documento son resistentes a la degradación por RNasa H.

En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos antisentido comprenden al menos un nucleótido modificado. En otra realización, los compuestos antisentido comprenden un nucleótido modificado en cada posición. En otra realización más, los compuestos antisentido se modifican uniformemente en cada posición.

La modulación del empalme se puede ensayar de diversas formas conocidas en la técnica. Los niveles de ARNm objetivo se pueden cuantificar, por ejemplo, mediante análisis de transferencia Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) competitiva o PCR en tiempo real. El análisis de ARN se puede realizar en ARN celular total o poli(A)+ARNm mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos de aislamiento de ARN se enseñan, por ejemplo, en Ausubel, FM et al., Current Protocols in Molecular Biology, volumen 1, páginas 4.1.1-4.2.9 y 4.5.1-4.5.3, John Wiley & Sons, Inc., 1993.

El análisis de transferencia Northern es rutinario en la técnica y se enseña, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 1, páginas 4.2.1-4.2.9, John Wiley & Sons, Inc., 1996. La PCR cuantitativa en tiempo real puede llevarse a cabo convenientemente utilizando el sistema de detección de secuencias ABI PRISM™ 7700 disponible en el mercado, disponible a través de PE-Applied Biosystems, Foster City, California y utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los niveles de una proteína codificada por un ARNm objetivo se pueden cuantificar en una variedad de formas bien conocidas en la técnica, tales como inmunoprecipitación, análisis de transferencia Western (inmunotransferencia), ELISA o clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Los anticuerpos dirigidos a una proteína codificada por un ARNm objetivo pueden identificarse y obtenerse de diversas fuentes, tales como el catálogo de anticuerpos MSRS (Aerie Corporation, Birmingham, Michigan), o pueden prepararse mediante métodos convencionales de generación de anticuerpos. Los métodos para la preparación de antisueros policlonales se enseñan, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 11.12.1-11.12.9, John Wiley & Sons, Inc., 1997. La preparación de anticuerpos monoclonales se enseña, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 11.4.1-11.11.5, John Wiley & Sons, Inc., 1997.

Los métodos de inmunoprecipitación son estándar en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 10.16.1-10.16.11, John Wiley & Sons, Inc., 1998. El análisis de transferencia Western (inmunotransferencia) es estándar en la técnica y se puede encontrar, por ejemplo, en Ausubel, FM et al., Current Protocols in Molecular Biology, Volumen 2, páginas 10.8.1-10.8.21, John Wiley & Sons, Inc., 1997. Los ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) son estándar en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, volumen 2, páginas 11.2.1-11.2.22, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

El efecto de los compuestos oligoméricos de la presente invención puede analizarse mediante RT PCT, qPCR, PCR del exón lateral y/o un método que comprende

PCR del exón lateral en cada exón interno correspondiente al ARNm para obtener uno o más productos de amplificación del exón lateral, y detectar la presencia y longitud de dichos productos de amplificación del exón lateral, cuantificación de cada exón que codifica una proteína de dicho ARNm.

Los compuestos oligoméricos proporcionados en el presente documento pueden utilizarse con fines terapéuticos o de investigación. Además, los compuestos antisentido, que son capaces de inhibir la expresión génica o modular el empalme con especificidad, pueden usarse para dilucidar la función de genes particulares o productos génicos o para distinguir entre funciones de varios miembros de una vía biológica. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos se utilizan en el tratamiento de la enfermedad de Pompe. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, los compuestos oligoméricos se utilizan en la investigación de la función del gen GAA.

Los compuestos descritos en el presente documento se pueden usar para modular el empalme de un ARNm objetivo en metazoos, preferiblemente mamíferos, preferiblemente humanos.

Por ejemplo, la modulación del empalme de un ARNm objetivo puede medirse determinando los niveles de productos de empalme del ARNm en un fluido corporal, tejido, órgano o células del animal. Los fluidos corporales incluyen, pero no se limitan a, sangre (suero o plasma), fluido linfático, fluido cerebroespinal, semen, orina, fluido sinovial y saliva y pueden obtenerse mediante métodos rutinarios para los expertos en la técnica. Los tejidos, órganos o células incluyen, pero no se limitan a, sangre (por ejemplo, células hematopoyéticas, tales como células progenitoras hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas, células CD34+, células CD4+), linfocitos y otras células de linaje sanguíneo, piel, médula ósea, bazo, timo, ganglio linfático, cerebro, médula espinal, corazón, músculo esquelético, hígado, tejido conectivo, páncreas, próstata, riñón, pulmón, mucosa oral, esófago, estómago, ilion, intestino delgado, colon, vejiga, cuello uterino, ovario, testículos, glándula mamaria, glándula suprarrenal y tejido adiposo (blanco y marrón). Las muestras de tejidos, órganos y células pueden obtenerse rutinariamente mediante biopsia. En algunas situaciones alternativas, se pueden recuperar muestras de tejidos u órganos de un animal después de su muerte. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, la modulación del empalme se mide en fibroblastos, preferiblemente fibroblastos primarios, preferiblemente fibroblastos primarios de pacientes que padecen la enfermedad de Pompe.

Los efectos del tratamiento con los compuestos oligoméricos pueden evaluarse midiendo biomarcadores asociados con la modulación del empalme de un ARNm objetivo en los fluidos, tejidos u órganos antes mencionados, recogidos de un animal en contacto con uno o más compuestos, mediante métodos clínicos de rutina conocidos en la técnica. Estos biomarcadores incluyen pero no se limitan a: glucosa, colesterol, lipoproteínas, triglicéridos, ácidos grasos libres y otros marcadores del metabolismo de glucosa y lípidos; transaminasas hepáticas, bilirrubina, albúmina, nitrógeno ureico en sangre, creatina y otros marcadores de función renal y hepática; interleucinas, factores de necrosis tumoral, moléculas de adhesión intracelular, proteína C reactiva y otros marcadores de inflamación; testosterona, estrógeno y otras hormonas; marcadores tumorales; vitaminas, minerales y electrolitos. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, el biomarcador es glucógeno.

Los compuestos divulgados en el presente documento se pueden utilizar en composiciones farmacéuticas añadiendo una cantidad eficaz de un compuesto a un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado. Los compuestos también se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades y trastornos relacionados con alteraciones en el empalme.

También se contemplan métodos mediante los cuales los fluidos corporales, órganos o tejidos se ponen en contacto con una cantidad eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones antisentido de la divulgación. Los fluidos corporales, órganos o tejidos pueden ponerse en contacto con uno o más de los compuestos de la divulgación dando como resultado la modulación del empalme del ARNm objetivo en las células de fluidos corporales, órganos o tejidos. Se puede determinar una cantidad eficaz controlando el efecto modulador del compuesto o compuestos antisentido o las composiciones sobre los ácidos nucleicos objetivo o sus productos mediante métodos rutinarios para el experto en la materia. Se contemplan además métodos de tratamiento *ex vivo* en los que se aíslan células o tejidos de un sujeto, se ponen en contacto con una cantidad eficaz del compuesto o compuestos o composiciones antisentido y se reintroducen en el sujeto mediante métodos rutinarios conocidos por los expertos en la materia.

Una cantidad suficiente de un compuesto oligomérico antisentido a administrar será una cantidad suficiente para inducir la mejora de los síntomas de enfermedad no deseados. Dicho cantidad puede variar, entre otras cosas, dependiendo de factores tales como el género, la edad, el peso, la condición física general del paciente, etc., y puede determinarse caso por caso. La cantidad también puede variar de acuerdo con el tipo de afección que se esté tratando y los otros componentes de un protocolo de tratamiento (por ejemplo, administración de otros medicamentos tales como esteroides, etc.). La cantidad también puede variar de acuerdo con el método de administración, tal como sistémica o localmente.

Las cantidades de dosificación típicas de las moléculas de oligonucleótidos antisentido en las formulaciones farmacéuticas pueden oscilar entre aproximadamente 0.05 y 1000 mg/kg de peso corporal y, en particular, entre aproximadamente 5 y 500 mg/kg de peso corporal. En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, la cantidad de dosificación es de aproximadamente 50 a 300 mg/kg de peso corporal una vez cada 2 semanas, o una o dos veces por semana, o cualquier frecuencia requerida para lograr el efecto terapéutico. Las cantidades adecuadas son de 3 a 50 mg/kg, más adecuadamente de 10 a 40 mg/kg, más adecuadamente de 15 a 25 mg/kg.

La dosificación administrada, por supuesto, variará dependiendo del uso y de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas del ingrediente activo; edad, salud y peso del receptor; naturaleza y extensión de los síntomas, tipo de tratamiento concurrente, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El receptor puede ser cualquier tipo de mamífero, pero preferiblemente es un ser humano. En una realización de la invención y/o realizaciones de la misma, las formas de dosificación (composiciones) de la composición farmacéutica de la invención pueden contener aproximadamente de 1 microgramo a 50,000 microgramos de ingrediente activo por unidad y, en particular, de aproximadamente 10 a 10,000 microgramos de ingrediente activo por unidad (si en el presente documento una unidad significa un vial o un empaque para una inyección, entonces será mucho mayor, hasta 15 g si el peso del paciente es de 50 kg). Para la administración intravenosa, una dosis unitaria de la formulación farmacéutica generalmente contendrá de 0.5 a 500 microgramos por kg de peso corporal y preferiblemente contendrá de 5 a 300 microgramos, en particular 10, 15, 20, 30, 40, 50, 100, 200 o 300 microgramos por kg de peso corporal ([mu]g/kg de peso corporal) de la molécula de oligonucleótido antisentido. La dosificación intravenosa preferida varía de 10 ng a 2000 microgramos, preferiblemente de 3 a 300 [mg, más preferiblemente de 10 a 100 ([mu]g de compuesto por kg de peso corporal. Alternativamente, la dosis unitaria puede contener de 2 a 20 miligramos de la molécula de oligonucleótido antisentido y administrarse en múltiplos, si se desea, para proporcionar la dosis diaria anterior. En estas composiciones farmacéuticas, la molécula de oligonucleótido antisentido normalmente estará presente en una cantidad de aproximadamente 0.5-95 % en peso con respecto al peso total de la composición.

En una realización particular, debe reconocerse que la dosis puede aumentarse o disminuirse en función de la respuesta individual del paciente. Se apreciará que las cantidades reales de molécula de oligonucleótido antisentido utilizadas variarán de acuerdo con la molécula de oligonucleótido antisentido específica que se utilice, las composiciones particulares formuladas, el modo de aplicación y el sitio particular de administración.

Preferiblemente, los compuestos se administran diariamente, una vez cada 2 días, una vez cada 3 días, una vez a la semana, una vez cada dos semanas o una vez al mes.

En otra realización preferida, la administración es solo una vez, por ejemplo, cuando se usa un vector viral.

Si se elige una administración viral de compuestos oligoméricos antisentido, las dosis adecuadas dependerán de diferentes factores, tales como la cepa viral que se emplee, la vía de administración (intramuscular, intravenosa, intraarterial u otra). Los expertos en la técnica reconocerán que dichos parámetros normalmente se elaboran durante los ensayos clínicos. Además, los expertos en la técnica reconocerán que, aunque los síntomas de la enfermedad pueden aliviarse completamente mediante los tratamientos descritos en el presente documento, este no tiene por qué ser el caso. Incluso un alivio parcial o intermitente de los síntomas puede ser de gran beneficio para el receptor. Además, el tratamiento del paciente no suele ser un evento único. Más bien, los compuestos oligoméricos antisentido de la invención probablemente se administrarán en múltiples ocasiones, que pueden ser, dependiendo de los

resultados obtenidos, con varios días de diferencia, con varias semanas de diferencia, con varios meses de diferencia, o incluso con varios años de diferencia.

Los expertos en la técnica reconocerán que hay muchas formas de determinar o medir un nivel de funcionalidad de una proteína y de determinar un nivel de aumento o disminución de la funcionalidad, por ejemplo, en respuesta a un protocolo de tratamiento. Dichos métodos incluyen, pero no se limitan a, medir o detectar una actividad de la proteína, etc. Tales mediciones generalmente se realizan en comparación con una muestra estándar o de control o "normal". Además, cuando la falta de funcionalidad de la proteína está involucrada en el proceso de una enfermedad, los síntomas de la enfermedad pueden monitorearse y/o medirse para detectar indirectamente la presencia o ausencia de una proteína que funcione correctamente, o para medir el éxito de un protocolo de tratamiento destinado para remediar la falta de funcionamiento de la proteína. En una realización preferida, se mide la funcionalidad de la proteína GAA. Esto se realiza adecuadamente con ensayos de actividad de la enzima como es bien conocido por un experto en la materia.

Los oligonucleótidos antisentido de la invención pueden administrarse *in vivo* solos o en asociación con un vector. En su sentido más amplio, un "vector" es cualquier vehículo capaz de facilitar la transferencia del oligonucleótido antisentido de la invención a las células. Preferiblemente, el vector transporta el ácido nucleico a las células con degradación reducida en relación con el grado de degradación que resultaría en ausencia del vector. En general, los vectores útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, plásmidos desnudos, sistemas de suministro no viral (electroporación, sonoporación, agentes de transfección catiónicos, liposomas, etc...), fagémidos, virus, otros vehículos derivados de virus o fuentes bacterianas que han sido manipuladas mediante la inserción o incorporación de las secuencias de ácidos nucleico del oligonucleótido antisentido. Los vectores virales son un tipo preferido de vector e incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácido nucleico de los siguientes virus: virus R A tales como un retrovirus (como por ejemplo el virus de la leucemia murina de Moloney y vectores derivados de lentivirus), el virus del sarcoma murino de Harvey, el virus del tumor mamario murino y el virus del sarcoma de Rous; adenovirus, virus adenoasociado; virus tipo SV40; virus de polioma; virus de Epstein-Barr; virus del papiloma; virus del herpes; virus vaccinia; virus de la poliomielitis. Se pueden emplear fácilmente otros vectores no mencionados pero conocidos en la técnica.

Los vectores virales preferidos incluyen adenovirus y virus adenoasociados (AAV), que son virus de ADN que ya han sido aprobados para uso humano en terapia génica. Actualmente se conocen 12 serotipos diferentes de AAV (AAV1 a 12), cada uno con diferentes tropismos tisulares (Wu, Z Mol Ther 2006; 14: 316-27). Los AAV recombinantes se derivan del AAV dependiente de parvovirus (Choi, VW J Virol 2005; 79:6801-07). El virus adenoasociado tipo 1 a 12 se pueden modificar para que sea deficiente en replicación y sea capaz de infectar una amplia gama de tipos y especies de células (Wu, Z Mol Ther 2006; 14:316-27). Además tiene ventajas tales como estabilidad frente al calor y los disolventes de lípidos; altas frecuencias de transducción en células de diversos linajes, incluidas células hematopoyéticas; y falta de inhibición de superinfección, lo que permite múltiples series de transducciones. Además, las infecciones por virus adenoasociados de tipo silvestre se han seguido en cultivos de tejidos durante más de 100 pases en ausencia de presión selectiva, lo que implica que la integración genómica del virus adenoasociado es un evento relativamente estable. El virus adenoasociado también puede funcionar de forma extracromosómica.

Otros vectores incluyen vectores de plásmidos. Los vectores de plásmidos se han descrito ampliamente en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989. Son particularmente ventajosos para esto porque no tienen los mismos problemas de seguridad que muchos de los vectores virales. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula huésped, pueden expresar un péptido de un gen codificado operativamente dentro del plásmido. Algunos plásmidos de uso común incluyen pBR322, pUC18, pUC19, pRC/CMV, SV40 y pBlueScript. Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos en la materia. Además, los plásmidos se pueden diseñar a la medida utilizando enzimas de restricción y reacciones de ligamiento para eliminar y agregar fragmentos específicos de ADN. Los plásmidos pueden administrarse por una variedad de vías parenteral, mucosa y tópica. Por ejemplo, el plásmido de ADN se puede inyectar por vía intramuscular, intradérmica, subcutánea u otras vías. También puede administrarse mediante aerosoles o gotas intranasales, supositorios rectal y por vía oral. Preferiblemente, dicho plásmido de ADN se inyecta por vía intramuscular o intravenosa. También se puede administrar en la epidermis o en una superficie mucosa usando una pistola de genes. Los plásmidos pueden administrarse en una solución acuosa, secarse sobre partículas de oro o en asociación con otro sistema de administración de ADN que incluye, pero no se limitan a, liposomas, dendrímeros, cocleato y microencapsulación.

La secuencia de ácido nucleico del oligonucleótido antisentido puede estar bajo el control de una región reguladora heteróloga, por ejemplo, un promotor heterólogo. El promotor también puede ser, por ejemplo, un promotor viral, tal como el promotor del CMV o cualquier promotor sintético. El vector puede codificar más de un compuesto oligomérico antisentido. Cada compuesto oligomérico antisentido se refiere a diferentes objetivos.

La composición farmacéutica que comprende los compuestos antisentido descritos en el presente documento puede comprender sales, ésteres o sales de dichos ésteres farmacéuticamente aceptables, o cualquier otro equivalente químico funcional que, al administrarse a un animal, incluido un ser humano, sea capaz de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o residuo del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se refiere a profármacos y sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos antisentido, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes.

El término "profármaco" indica un agente terapéutico que se prepara en una forma inactiva o menos activa que se convierte en una forma activa (es decir, un fármaco) dentro del cuerpo o sus células mediante la acción de enzimas, sustancias químicas y/o condiciones endógenas. En particular, las versiones de profármacos de los oligonucleótidos se preparan como derivados de SATE (fosfato de (S-acetil-2-tioetilo)) de acuerdo con los métodos divulgados en los documentos WO 93/24510 o WO 94/26764. Los profármacos también pueden incluir compuestos antisentido en los que uno o ambos extremos comprenden nucleótidos que se escinden (por ejemplo, mediante la incorporación de enlaces de cadena principal fosfodiéster en los extremos) para producir el compuesto activo.

El término "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de los compuestos: es decir, sales que retienen la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparten efectos toxicológicos no deseados al mismo. Las sales de sodio de los oligonucleótidos antisentido son útiles y están bien aceptadas para la administración terapéutica a seres humanos. En otra realización de la invención y/o realizaciones de la misma, también se proporcionan sales de sodio de compuestos de ARNbc.

Los compuestos antisentido descritos en el presente documento también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o bien asociar con otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos.

La presente divulgación también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos antisentido descritos en el presente documento. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de varias formas dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área a tratar. En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, la administración es intramuscular o intravenosa.

Las formulaciones farmacéuticas, que pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria, pueden prepararse de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Dichas técnicas incluyen la etapa de poner en asociación los ingredientes activos con el vehículo o vehículos, o excipiente o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones se preparan asociando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos, vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y luego, si es necesario, moldeando el producto (por ejemplo, en un tamaño de partícula específico para la administración). En una realización preferida de la invención y/o realizaciones de la misma, las formulaciones farmacéuticas se preparan para administración intramuscular en un disolvente apropiado, por ejemplo, agua o solución salina normal, posiblemente en una formulación estéril, con vehículos u otros agentes.

Un "vehículo farmacéutico" o "excipiente" puede ser un disolvente farmacéuticamente aceptable, un agente de suspensión o cualquier otro vehículo farmacológicamente inerte para suministrar uno o más ácidos nucleicos a un animal y son conocidos en la técnica. El excipiente puede ser líquido o sólido y se selecciona teniendo en cuenta la forma planificada de administración, para proporcionar el volumen, la consistencia, etc. deseados, cuando se combina con un ácido nucleico y los demás componentes de una composición farmacéutica dada.

Las composiciones proporcionadas en este documento pueden contener dos o más compuestos antisentido. En otra realización relacionada, las composiciones pueden contener uno o más compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, dirigidos a un primer ácido nucleico y uno o más compuestos antisentido adicionales dirigidos a un segundo objetivo de ácido nucleico. Alternativamente, las composiciones proporcionadas en este documento pueden contener dos o más compuestos antisentido dirigidos a diferentes regiones del mismo objetivo de ácido nucleico. Se pueden usar dos o más compuestos combinados juntos o secuencialmente. Las composiciones también se pueden combinar con otros agentes terapéuticos de compuestos no antisentido.

El compuesto oligomérico antisentido descrito en el presente documento puede mezclarse con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidropropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietilén sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietilen sorbitán. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo. Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el ingrediente activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente de suspensión y uno o más conservantes. Las composiciones de compuestos oligoméricos antisentido pueden estar en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Las suspensiones se pueden formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados que se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente aceptable parenteralmente no tóxico, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro de sodio. Además, los aceites fijos estériles se emplean convencionalmente como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite

fijo suave, incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de inyectables.

La presente divulgación también incluye composiciones de compuestos oligoméricos antisentido preparadas para almacenamiento o administración que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington´s Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., AR Gennaro edit., 1985). Por ejemplo, se pueden proporcionar conservantes y estabilizadores. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Las composiciones farmacéuticas de esta divulgación también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o mezclas de estos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden ser gomas naturales, por ejemplo, goma arábiga o goma tragacanto, fosfátidos naturales, por ejemplo, soja, lecitina y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y hexitol, anhídridos, por ejemplo, monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de polioxietilensorbitán.

El compuesto oligomérico antisentido de esta divulgación se puede administrar a un paciente por cualquier medio estándar, con o sin estabilizadores, tampones o similares, para formar una composición adecuada para el tratamiento. Cuando se desea utilizar un mecanismo de administración de liposomas, se pueden seguir los protocolos estándar para la formación de liposomas. Por lo tanto, el compuesto oligomérico antisentido de la presente divulgación puede administrarse en cualquier forma, por ejemplo, por vía intramuscular o por inyección local, sistémica o intratecal.

Esta divulgación también presenta el uso de composiciones de compuestos oligoméricos antisentido que comprenden liposomas de superficie modificada que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (liposomas modificados con PEG o de circulación prolongada o liposomas sigilosos). Estas formulaciones ofrecen un método para aumentar la acumulación de compuestos oligoméricos antisentido en los tejidos objetivo. Esta clase de transportadores de fármacos resiste la opsonización y la eliminación por parte del sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), lo que permite tiempos de circulación sanguínea más prolongados y una mayor exposición tisular para el compuesto oligomérico antisentido encapsulado (Lasic et al., Chem. Rev. 95: 2601-2627 (1995)) e Ishiwata et al., Chem. Pharm. Bull. 43: 1005-1011 (1995). Los liposomas de circulación prolongada mejoran la farmacocinética y la farmacodinámica de los compuestos oligoméricos antisentido, en particular en comparación con los liposomas catiónicos convencionales que se sabe que se acumulan en los tejidos de la MPS. Liu et al., J. Biol, Chem. 42: 24864-24870 (1995); Choi et al., publicación PCT No. WO 96/10391; Ansell et al., publication PCT No. WO 96/10390; Holland et al., publication PCT No. WO 96/10392). También es probable que los liposomas de circulación prolongada protejan al compuesto oligomérico antisentido de la degradación por nucleasas en mayor medida que los liposomas catiónicos, en función de su capacidad para evitar la acumulación en tejidos MPS metabólicamente agresivos, tales como el hígado y el bazo.

Después de la administración de las composiciones de compuestos oligoméricos antisentido de acuerdo con las formulaciones y los métodos de esta divulgación, los sujetos de prueba exhibirán una reducción de aproximadamente el 10 % hasta aproximadamente el 99 % en uno o más síntomas asociados con la enfermedad o trastorno que se está tratando, en comparación con sujetos tratados con placebo u otros controles adecuados.

Ejemplos

Ejemplo 1

Las mutaciones que afectan el empalme de pre-ARNm son difíciles de predecir debido al complejo mecanismo de regulación del empalme. Un enfoque genérico para detectar y caracterizar sistémicamente los efectos de las variantes de secuencia en el empalme mejoraría la práctica diagnóstica actual. En el presente documento, se muestra que tal enfoque es factible mediante la combinación de RT-PCR del exón lateral, análisis de secuencia de productos de PCR y RT-PCR cuantitativa interna del exón para todos los exones de codificación. Se ha aplicado a mutaciones no caracterizadas en el gen de la glucosidasa alfa ácida que causa la enfermedad de Pompe, una enfermedad autosómica recesiva monogénica. Los efectos sobre el empalme incluyeron el uso del sitio de empalme críptico, la retención de intrones y la omisión del exón. Estos diferían de las predicciones *in silico*, destacando la necesidad de pruebas experimentales. La cuantificación de la extensión del empalme de tipo silvestre defectuoso se correlacionó con la gravedad de la enfermedad.

Materiales y métodos

Pacientes y control sano

Los pacientes fueron diagnosticados con la enfermedad de Pompe de acuerdo con los síntomas clínicos y la actividad de la enzima GAA. Todos los pacientes y el control sano dieron su consentimiento informado para el análisis molecular.

Nomenclatura

Las posiciones de las mutaciones descritas están alineadas contra el número de asociación de ADNc de Ensembl GAA ENST00000302262.3. c.1 indica el primer nucleótido de la región codificante del ARNm de GAA. La numeración adicional está de acuerdo con los estándares de HGVS [14].

Cultivo celular y preparación de ADNc

Se aislaron fibroblastos de biopsias de piel de pacientes y de un individuo sano. Las células se cultivaron en DMEM alto en glucosa (Lonza) + suero bovino fetal al 10 % (HyClone, Thermo Scientific) + penicilina/estreptomicina al 1% (Lonza). El ARN se aisló utilizando el kit miniprep RNAeasy (Qiagen). Se usaron 800 ng de ARN para la generación de ADNc usando el kit de síntesis de ADNc iScript (Biorad). El ADNc se diluyó 10 veces antes de su uso.

Análisis por PCR del exón lateral

El cDNA se amplificó usando Taq Polimerasa FastStart (Roche). Los cebadores se usaron a una concentración final de 0,333 µM cada uno, los dNTP a 0,333 mM cada uno. El programa de PCR se realizó en un termociclador Biorad s1000 (96 °C durante 4 min., 35X [96 °C 20 seg, 60 °C 30 seg, 72 °C 1 min], 72°C 5 min). Se procesaron 5 µl de cada reacción de PCR en un gel de agarosa al 1,5 % que contenía bromuro de etidio. Los geles se fotografiaron en un generador de imágenes en gel Typhoon FLA 9000 (G&E Healthcare). Los cebadores utilizados se enumeran en la Figura 15.

Análisis por qPCR interno del exón

Para determinar la concentración relativa de cada muestra, se procesaron 4 µl de cada muestra de ADNc (diluida 10 veces en H_2O) en una reacción de PCR de 15 µl que contenía IQ Mastermix (Biorad) y 0,333 µM de cada cebador. Para tener en cuenta la eficacia de cada conjunto de cebadores específicos, todas las muestras se relacionaron con una curva estándar de la muestra de control sano. Todas las muestras se midieron por triplicado. Los cebadores utilizados se enumeran en la Figura 16.

Secuenciación de Sanger

Las mutaciones del ADN genómico se identificaron en el departamento de diagnóstico de Genética Clínica en el Erasmus MC, Rotterdam, Países Bajos. La secuenciación directa de los productos de PCR del exón lateral se realizó utilizando el kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Para obtener muestras de ADN puro, los productos de PCR visibles en el gel en el ensayo de empalme se pincharon con una punta de pipeta de 20 µl y el ADN de la punta se resuspendió en 10 µl de H_2O. Posteriormente, se usó 1 µl en una nueva PCR (como se describe en el ensayo de empalme) para obtener ADN de una sola plantilla. El exceso de cebadores y dNTP se eliminó utilizando fosfatasa alcalina termosensible FastAP (Thermo Scientific), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras se purificaron con Sefadex G-50 (GE Healthcare) y la secuencia se determinó en un analizador genético AB3130 (Applied Biosystems, Hitachi).

Actividad de la enzima GAA

La actividad de GAA en fibroblastos se midió con 4-metilumbeliferil-α-glucopiranósido (4-MU) o con glucógeno como sustrato como se describe [15].

Resultados

Ensayo genérico para detectar mutaciones de empalme

El enfoque consta de dos partes. Primero (Fig. 1, izquierda), se realiza una RT-PCR genérica del ARNm de interés utilizando cebadores estándar que flanquean cada exón canónico individual (PCR del exón lateral). Los productos se separan por electroforesis en gel de agarosa. Los cambios en el tamaño del producto son indicativos de un empalme alternativo/aberrante. Las uniones de empalme se pueden determinar con precisión mediante la secuenciación de productos aislados del gel o mediante la secuenciación directa de la reacción PCR. En segundo lugar (Fig. 1, derecha), se realiza una qPCR estándar para cuantificar cada exón individual (qPCR interna del exón). Se utilizan cebadores que hibridan dentro de cada exón. Los resultados se normalizan para el ARNm de beta-actina y para la expresión en un control sano. Los resultados cuantifican la omisión/inclusión del exón y también pueden indicar si una mutación de empalme permite un empalme defectuoso de tipo silvestre.

Desarrollo y validación del ensayo

Control sano

El ensayo se desarrolló utilizando un control sano. Para detectar las uniones de empalme y los tamaños de los exones, se realizó un análisis por PCR del exón lateral en ADNc preparado a partir de fibroblastos primarios utilizando cebadores que se hibridan con los exones laterales (Fig. 2A). La electroforesis en gel y la tinción con bromuro de etidio mostraron productos de peso molecular correcto en todos los casos. Esto indicó empalme canónico para todos los exones en estas células. Se observaron algunos productos adicionales en cantidades menores, en particular, justo por encima del exón 6 y 7. El análisis de secuencia indicó que estos representan productos en los que se retuvo el

intrón 6. Los productos se observaron en este control sano y en muchos pacientes con Pompe y pueden indicar un empalme aberrante ruidoso, que es un fenómeno conocido [16]. Los exones individuales se cuantificaron mediante qPCR interna del exón (Fig. 1B). Los valores se normalizaron para la expresión de β-actina (medida mediante análisis por qPCR) y luego estuvieron listos para usar para la normalización de las muestras de prueba.

Paciente 1

Este paciente se usó para validar si una mutación de empalme bien descrita podía detectarse con precisión en fibroblastos primarios usando el ensayo descrito anteriormente. Se eligió la mutación c.-32-13T>G (IVS1) porque es una mutación frecuente que causa la aparición juvenil/adulta de la enfermedad de Pompe. Se encuentra en el intrón 1, cerca del sitio del aceptor de empalme del exón 2, y provoca un empalme aberrante del exón 2, pero también permite un empalme defectuoso de tipo silvestre [17, 18]. Se sabe que el segundo alelo se expresa en niveles muy bajos debido a la NMD [19]. Esto es causado por la mutación c.1636+5G>T, que conduce a la inclusión del intrón 11 y un codón de terminación prematuro. Por esta razón, el alelo que contiene la mutación IVS1 domina en el ensayo de empalme que se describe a continuación.

El análisis por PCR del exón lateral produjo tres productos principales de la amplificación del exón 2 (Fig. 2A). Estos productos se analizaron mediante secuenciación de ADN, lo que indicó que el producto 1 representaba el exón 2 completo con uniones de empalme canónicas (Fig. 9). El producto 2 contenía el exón 2 parcialmente omitido debido a la utilización de un sitio de aceptor de empalme críptico en c.486, mientras que el producto 3 representaba el exón 2 completamente omitido (Fig. 2A y S2). Estos productos corresponden a las principales variantes de empalme notificadas para la mutación IVS1, a saber, normal (N) (producto 1), variante de empalme (SV) 1 (producto 2) y SV2 (producto 3) [18].

El análisis por qPCR interno del exón mostró una expresión del 10-15 % del exón 2 y todos los demás exones (Fig. 2). Esto se puede explicar de la siguiente manera. La mutación IVS1 permite el empalme defectuoso de tipo silvestre del exón 2 (producto 1 en la Fig. 2A) que produce un ARNm normal que contiene todos los exones, como se señaló anteriormente ([18, 20]. Los otros 2 productos principales 2 y 3 dan como resultado la eliminación del inicio canónico de la traducción, que se encuentra en el exón 2. Esto conduce a la degradación del ARNm, lo que da como resultado una contribución menor en el ensayo cuantitativo de qPCR interno del exón y la detección predominante del ARNm de GAA defectuoso de tipo silvestre del alelo IVS1. En conclusión, los efectos conocidos de la mutación IVS1 en el empalme se detectaron fielmente mediante el ensayo de empalme genérico para GAA. El empalme defectuoso de tipo silvestre fue del 10 al 15 % de los niveles de control sanos y explicó el inicio juvenil/adulto de la enfermedad de Pompe. Cabe señalar que los cinco programas de predicción de empalme utilizados en el presente documento (similar a SpliceSiteFinder (SSF), MaxEntScan (MES), NNSplice (NNS), GeneSplicer (GS) y Human Splicing Finder (HSF)) no detectaron un efecto de la mutación IVS1 en el empalme (Fig. 14A).

Paciente 2

Este paciente fue elegido para probar la sensibilidad del ensayo. Debido a una mutación homocigota c.525delT, la expresión del ARNm de GAA es muy baja debido a la NMD [21]. Sorprendentemente, el análisis por PCR del exón lateral mostró que todos los exones todavía podían detectarse en los tamaños correctos, aunque a niveles reducidos (Fig. 8). También se observaron productos de mayor peso molecular a niveles aún más bajos. Estos pueden representar especies de pre-ARNm no empalmados, amplificados debido a la abundancia reducida de ARNm empalmados que compiten en la reacción PCR. Para cuantificar la cantidad de ARNm residual, se realizó qPCR interna del exón y mostró una expresión del 5-10 % de todos los exones en relación con el control sano (Fig. 8B). En conclusión, los ensayos de empalme genéricos para GAA permiten el análisis y la cuantificación de una expresión de ARNm muy baja. Esto es particularmente relevante para los ARNm que están sujetos a degradación como resultado de alteraciones del marco de lectura.

Paciente 3

Se realizó una tercera validación en un paciente que portaba una eliminación bien conocida removiendo todo el exón 18 más sus secuencias laterales (del ex18, o c.2481+102_2646+31del) (Fig. 2A). Este caso es interesante porque se eliminan los sitios de empalme del exón 18. Trabajos anteriores han demostrado que se forma un nuevo ARNm en el que el exón 17 se empalma ordenadamente con el exón 19 a través de sitios de empalme canónicos [17]. El marco de lectura de traducción del ARNm resultante permanece intacto, lo que sugiere que este ARNm no es susceptible de degradación a través de la ruta NMD (Figura 7-Tabla 2). La segunda mutación en este paciente, c.1548G>A, genera un codón de terminación en el exón 10 [22]. Hasta el momento no se han informado sus efectos sobre la expresión del ARNm. Es probable que el codón de terminación prematura resulte en una baja abundancia de ARNm de este alelo.

La PCR del exón lateral indicó cambios para la amplificación de los exones 17, 18 y 19 (Fig. 3A). La amplificación del exón 18 produjo dos productos en lugar de uno. El análisis de secuencia indicó que el producto de PM más alto (número 4) representaba el exón 18 empalmado de tipo silvestre, mientras que el producto de PM más bajo (número 5) carecía del exón 18 completo, y el exón 17 y el exón 19 se unieron a través de sus sitios de empalme canónicos (Fig. S3A). La amplificación de los exones 17 y 19 produjo cantidades inferiores de los productos correctos en

comparación con el control sano. Los cebadores utilizados para su amplificación hibridan con el exón 18, lo que indica que su detección no se pudo derivar del alelo delex18 sino que debió provenir del alelo c.1548G>A. Esto indica que el alelo c.1548G>A se expresa hasta cierto punto, y explica la detección de niveles moderados del exón 18 empalmado de tipo silvestre mediante PCR del exón lateral.

Para cuantificar la expresión del alelo c.1548G>A, se realizó qPCR interna del exón e indicó una expresión del 3 % del exón 18, mientras que todos los demás exones se expresaron en ~40-50 % de los niveles de control sanos (Fig. 3F). Esto muestra que la mutación c.1548G>A da como resultado una expresión de ARNm muy baja, medida por el bajo nivel de detección del exón 18. La expresión de todos los demás exones se deriva del alelo delex18, que produce un ARNm estable en el que se elimina con precisión el exón 18.

En resumen, el ensayo de empalme genérico también permite la detección y caracterización de eliminaciones exónicas. Se puede hacer una disección entre dos alelos comparando los resultados de la PCR del exón lateral y los ensayos de qPCR interna del exón.

Caracterización de nuevas mutaciones de empalme

A continuación, se analizó una serie de pacientes que contenían mutaciones parcialmente caracterizadas o no caracterizadas.

Paciente 4

El paciente 4 contenía una nueva mutación en c.-32-3C>G ubicada en el intrón 1 cerca del sitio aceptor de empalme del exón 2 (Fig. 3D). Se sospecha que esta mutación afecta el empalme del exón 2 en función de su similitud con la mutación c.-32-3C>A publicada [19]. En este estudio, se informó una omisión perfecta del exón 2. Los programas de predicción de empalme indicaron que la mutación c.-32-3C>G debilita el sitio aceptor de empalme del exón 2 para algunos pero no para todos los programas (Fig. 14C). El segundo alelo contenía una mutación previamente informada [23] pero no caracterizada en c.1551+1G>A que se encuentra en el intrón 10 cerca del sitio donante de empalme del exón 10 (Fig. 3E). De acuerdo con la similitud con la mutación c.1551+1G>C publicada [17, 24], se sospecha que la mutación c.1551+1G>A afecta el empalme del exón 10. Los programas de predicción de empalme indicaron la pérdida del sitio donante de empalme del exón 10 (Fig. 14C).

Los resultados del análisis por PCR del exón lateral indicaron un empalme anómalo de dos exones: el exón 2 y el exón 10 (Fig. 3C). La amplificación del exón 2 resultó en 3 productos principales, número 6-8, y el análisis de secuencia indicó que estos productos incluían empalme de tipo silvestre, omisión parcial del exón 2 a través del sitio aceptor de empalme críptico en c.486 en el exón 2 y omisión perfecta del exón 2, respectivamente (Fig. 3D y Fig. 10B). Esto indica que dos mutaciones independientes en el intrón 1, a saber, c.-32-13T>G, que se encuentra en el tracto de polipirimidina, y c.-32-3C>G, ubicada cerca del sitio aceptor de empalme, tienen el mismo resultado cualitativo con respecto al empalme del exón 2. Los programas de predicción de empalme fueron insuficientes para predecir con precisión este resultado. La amplificación por PCR del exón lateral del exón 10 dio como resultado dos productos principales, 9 y 10 (Fig. 3C). El análisis de secuencia mostró que el producto 9 contenía uniones de tipo silvestre entre los exones 9, 10 y 11, y que el producto 10 representaba la omisión precisa del ARNm del exón 10 (Fig. 3E y Fig. 10C) en el que el marco de lectura permanece intacto. Esto fue sorprendente porque el resultado más directo de un debilitamiento del sitio donante de empalme del exón 10 sería una falla en la eliminación del intrón 10 en lugar de una omisión del exón 10.

Para determinar la extensión de los defectos de empalme, se realizó qPCR interna del exón. El exón 10 se expresó en ~6 %, mientras que todos los demás exones se expresaron en ~50 % de los niveles de control sanos (Fig. 3F). Esto es coherente con la idea de que la mayoría del ARNm se deriva del alelo c.1551+1G>A en el que se omite el exón 10. El producto más corto tiene un marco de lectura sin cambios y se espera que sea estable. Por el contrario, el alelo c.-32-3C>G da como resultado una omisión (parcial) del exón 2, que se sabe que da como resultado una degradación del ARNm análoga a la mutación IVS1. El alelo c.-32-3C>G tiene solo una contribución menor a los resultados de la qPCR interna del exón. Su contribución puede juzgarse a partir de la expresión del exón 10, que puede resultar del empalme defectuoso de tipo silvestre de la mutación c.-32-3C>G. Sin embargo, una fuente alternativa para la expresión del exón 10 es la expresión defectuosa de tipo silvestre del alelo c.1551+1G>A. El nivel muy bajo de expresión del exón 10 indica que tanto c.-32-3C>G como c.1551+1G>A tienen niveles bajos o ausentes de expresión defectuosa de tipo silvestre. Esto indica que la mutación c.-32-3C>G puede ser más grave en comparación con la mutación IVS1, ya que la mutación IVS1 permite un mayor nivel de empalme de tipo silvestre del 10-15 % (Fig. 2D). El curso clínico de la enfermedad de Pompe indica un inicio juvenil para este paciente, consistente con un nivel bajo de expresión de GAA de tipo silvestre y niveles de actividad de la enzima GAA que fueron más bajos en comparación con los pacientes de inicio adulto (Figura 6-Tabla 1).

Paciente 5

El paciente 5 era homocigoto para c.1075G>A, que es una mutación de sentido erróneo p.Gly359Arg ubicada en el último par de bases del exón 6 (Fig. 4B) [25]. Esta mutación se ha clasificado como presumiblemente no patógena con posibles efectos sobre el empalme [26]. Está ubicado cerca del sitio donante de empalme del exón 6, y el análisis

de predicción de empalme indicó el debilitamiento de este sitio y el fortalecimiento de un sitio donante de empalme críptico 4 nucleótidos secuencia arriba (Fig. 14D).

El análisis por PCR del exón lateral mostró la ausencia de un producto para el exón 7, bajos niveles de los otros exones y un bajo nivel de un producto de bajo peso molecular para el exón 2 (Fig. 4A). Con base en las predicciones y en la ubicación de esta mutación en el exón 6, se sospecha que las uniones de empalme alrededor del exón 6 y 7 pueden estar alteradas. En concordancia, la secuenciación del producto de PCR del exón 6 (producto 11) mostró que en su lugar se usó el sitio donante de empalme críptico en el exón 6 ubicado 4 nucleótidos secuencia arriba en c.1071 (Fig. 4B y Fig. S4B). Esto explica la ausencia de un producto para el exón 7, ya que el cebador directo para la amplificación del exón 7 tiene 4 desajustes debido al sitio donante de empalme cambiado. Sorprendentemente, el ensayo por PCR del exón lateral no pudo detectar el empalme defectuoso de tipo silvestre para esta mutación. Esto habría resultado en la presencia de una banda de tipo silvestre para la amplificación del exón 7, que no se observó. Para investigar más a fondo el empalme del exón 7, se utilizó un cebador directo alternativo ubicado en el exón 5. Ahora se obtuvo el producto esperado y mostró empalme desde c.1071 en el exón 6 hasta el sitio aceptor del empalme canónico del exón 7 (Fig. 11A), como se observó para el análisis de secuencia del producto 11. El marco de lectura del ARNm resultante ha cambiado, lo que lleva a un codón de terminación prematuro (Tabla 2). El producto de bajo peso molecular obtenido con la amplificación del exón 2 no se ha perseguido más. Puede ser causado por una mutación intrónica aún no identificada. Alternativamente, se sabe que el ARNm de GAA de tipo silvestre tiene una omisión defectuosa del exón 2, cuyo producto puede amplificarse preferiblemente debido a la degradación del ARNm debido a la mutación c.1071.

La cuantificación de la expresión del ARNm de GAA mediante el ensayo de qPCR interna del exón mostró que todos los exones de GAA se expresaron a niveles muy bajos, muy por debajo de los niveles observados para la mutación IVS1 pero justo por encima de los niveles observados para la mutación c.525delT (Fig. 4G). Esto confirmó la noción de que los niveles de empalme defectuoso de tipo silvestre en este paciente son muy bajos o están ausentes, mientras que la mayoría del ARNm es inestable. En concordancia, se midió una actividad de GAA muy baja en fibroblastos y el diagnóstico de este paciente fue la forma infantil clásica más grave de la enfermedad de Pompe.

Paciente 6

El paciente 6 portaba una mutación homocigota c.1552-3C>G. Esta mutación se encuentra en el intrón 10 cerca del exón 11 (Fig. 4D). El análisis por PCR del exón lateral mostró un empalme aberrante del exón 10 con tres productos principales (12-14; Fig. 4E). El análisis de secuencia indicó que en el producto 14, el exón 10 se omitió por completo mientras que se utilizó un nuevo sitio aceptor de empalme cerca del exón 11 en c.1552-30 (Fig. 4D y 11C). Este ARNm deja intacto el marco de lectura (Tabla 2). El producto 13 se identificó como ARNm empalmado de tipo silvestre. El producto 12 consistía en ARNm en el que se retenía el intrón 10 completo. El marco de lectura se interrumpe en este producto de empalme. Mientras que los productos 13 y 14 se han detectado previamente [27], el producto 12 es nuevo. Curiosamente, los programas de predicción de empalme fueron ambivalentes en la predicción del grado de utilización de los sitios aceptores de empalme canónicos o crípticos del exón 11 (Fig. 14F). Además, el resultado fue inesperado en cualquier caso: no se esperaría que el debilitamiento del sitio aceptor de empalme del exón 11 resultara en la omisión del exón 10. En cambio, podrían imaginarse dos productos: uno en el que el sitio donante de empalme del exón 10 se empalma con el aceptor críptico en c.1552-30, lo que resulta en la extensión del exón 11 con una parte del intrón 10 y más empalme normal. El otro producto esperado sería una omisión perfecta del exón 11. El resultado completamente diferente ilustra que se requiere validación experimental para analizar las consecuencias moleculares de posibles mutaciones de empalme.

La cuantificación de los defectos de empalme se realizó con el ensayo por qPCR interno del exón. Esto mostró la expresión de todos los exones en ~ 20 % de los niveles de control sanos (Fig. 4G). No se observó una reducción adicional de la expresión del exón 10, lo que sugiere que la mayoría del ARNm incluía el exón 10, favoreciendo los productos 12 y 13 por encima del 14. La presencia de empalmes defectuosos de tipo silvestre (producto 13) es coherente con la actividad de la enzima GAA residual y el fenotipo más leve con el inicio de la enfermedad de Pompe en la edad adulta en este paciente (Tabla 1). En conclusión, c.1552-3C>G da como resultado varios defectos de empalme alrededor del exón 10 y el intrón 10, y permite un empalme defectuoso de tipo silvestre compatible con el inicio de la enfermedad en adultos.

Paciente 7

El paciente 7 era homocigoto para c.1437G>A, una mutación silenciosa ubicada en el sitio donante de empalme del exón 9 (Fig. 4F). El análisis por PCR del exón lateral mostró dos productos en lugar de uno para la amplificación del exón 9 y bajos rendimientos para la amplificación del exón 8 y el exón 10 (Fig. 4E). El análisis de secuencia indicó que el producto 15 representaba el exón 9 empalmado de tipo silvestre, mientras que en el producto 16, el exón 9 se omitió perfectamente, lo que resultó en una transcripción más corta en la que el marco de lectura no cambió (Fig. 4F y Fig. 11D). Como se esperaba por su ubicación, se predijo *in silico* que la mutación c.1437G>A se debilitaría para empalmar el sitio donante del exón 9 (Fig. 14E). Sin embargo, el resultado experimental fue sorprendente ya que se esperaba que la falla del sitio donante de empalme del exón 9 resultara en la inclusión del intrón 9 en lugar de omitir el exón 9. Los productos de la amplificación del exón 8 y el exón 10 tenían tamaños correctos pero menor rendimiento porque el

exón 9 tenía una disponibilidad reducida para servir como plantilla para la hibridación del cebador de PCR inversa (para el exón 8) o el cebador de PCR directo (para el exón 10).

La cuantificación mediante qPCR interna del exón mostró niveles de expresión casi normales (70-80 % del control) para todos los exones excepto el exón 9, que mostró una expresión de solo el 5 % del control sano. El inicio de la enfermedad juvenil/adulta de este paciente es consistente con la naturaleza defectuosa de la mutación del sitio de empalme (Tabla 1). En resumen, la mutación c.1437G>A da como resultado una omisión precisa del exón 9 que deja intacto el marco de lectura y permite un bajo nivel de empalme defectuoso de GAA de tipo silvestre.

Caracterización de un caso complejo: paciente 8

Genotipo

El paciente 8 contenía la mutación de sentido erróneo c.1256A>T en el alelo 1. Se encuentra en medio del exón 8, da como resultado p.Asp419Val y se ha clasificado como levemente patógeno (Fig. 5B) [26]. El segundo alelo contenía una mutación c.1551+1G>T, que se encuentra en el intrón 10 cerca del sitio donante de empalme del exón 10 [26]. Se parece a la mutación c.1551+1G>A descrita anteriormente para el paciente 4.

Análisis de productos de empalme

El análisis por PCR del exón lateral indicó múltiples productos de PCR de la amplificación de los exones 8, 9 y 10 (Fig. 5A). Todos estos productos se analizaron por secuenciación (Fig. 12). Esto indicó la presencia de empalme del exón 8 de tipo silvestre (producto 17) y la utilización de un nuevo sitio donante de empalme en el exón 8 en c.1254, que se encuentra 2 nt secuencia arriba de la mutación c.1256A>T (producto 18; Fig. 5B-C). Este donante se empalmó con el sitio aceptor de empalme canónico del exón 9 y el marco de lectura resultante no cambió (Tabla 2). De hecho, los programas de predicción de empalme mostraron que c.1254 se convirtió en un sitio donante de empalme debido a la mutación c.1256A>T (Fig. 14G). El sitio donante de empalme canónico del exón 8 se mantuvo sin cambios, y no estaba claro cuál de los dos sitios sería el preferido de las predicciones *in silico*. El producto 21 representó el empalme de tipo silvestre del exón 10, mientras que el producto 22 fue el resultado de una omisión perfecta del exón 10 en la que el marco de lectura permaneció intacto (Fig. 5D y Fig. 12). La pérdida del sitio donante de empalme del exón 10 por la mutación c.1551+1G>T fue consistente con las predicciones de empalme (Fig. 14G), pero el resultado no se anticipó, ya que la inclusión del intrón 10 en lugar de la omisión del exón 10 parecía la consecuencia más lógica.

Evidencia de bajos niveles de empalme defectuoso de tipo silvestre

Junto con el análisis por qPCR interno del exón que se describe a continuación, el ensayo por PCR del exón lateral proporciona información sobre la gravedad de las mutaciones a través de las intensidades relativas de los productos. Estos pueden explicarse en función de la identificación de los productos de empalme (Fig. 5B-D) y de las ubicaciones de los cebadores utilizados para la amplificación (Fig. 13).

Exón 7

La detección del exón 7 se realiza con un cebador directo que se hibrida con el extremo 3' del exón 6 y un cebador inverso con el extremo 5' del exón 8 (Fig. 13). El extremo 5' del exón 8 se retiene en todos los casos mientras que la parte 3' se empalma en el alelo c.1256A>T. Por lo tanto, la detección por PCR del exón lateral del exón 7 no debería verse afectada en este paciente y este fue de hecho el caso (Fig. 5A).

Exón 8

Los cebadores de PCR del exón lateral utilizados para la detección del exón 8 se hibridan con el exón 7 y 9 (Fig. 13). Ambos exones no se ven afectados en este paciente, lo que predice que todas las alteraciones de empalme del propio exón 8 deberían detectarse de manera semicuantitativa. De hecho, se detectó un producto de tipo silvestre fuerte (número 17), dominado por el alelo 2, y se detectó un producto 18 más pequeño y ligeramente más débil debido al nuevo sitio donante de empalme críptico en c.1254 en el alelo 1. Se espera que el 50 % máximo del producto 17 se derive del alelo 2 y su mayor abundancia en comparación con el producto 18, lo que sugiere por lo tanto, que el alelo 1 tiene un empalme defectuoso de tipo silvestre.

Exón 9

Cebadores de PCR para la detección del exón 9 mediante la hibridación por PCR del exón lateral con la parte 5' del exón 8, que es la parte que no se omite en el alelo 1, y con el exón 10, que se omite por completo en el alelo 2 (Fig. 12). Esto complica la detección del exón 9 de estos dos alelos: un producto del alelo 1 sería más corto de lo normal debido a la omisión parcial del exón 8. Un producto del alelo 2 no es posible debido a la omisión precisa del exón 10, mientras que este exón es necesario para la hibridación del cebador. El producto predominante obtenido fue el producto más corto número 20 que se derivó del alelo 1. Sin embargo, también se observó una pequeña cantidad del producto de tipo silvestre número 19. Esto indica que al menos uno de los dos alelos permite el empalme defectuoso de tipo silvestre.

Exón 10

El análisis por PCR del exón lateral del exón 10 se realiza con cebadores que hibridan en el exón 9 y el exón 11, los cuales no se ven afectados. Por lo tanto, el resultado refleja las alteraciones del empalme del exón 10 de forma semicuantitativa. El producto 21 que representa el empalme de tipo silvestre fue el más abundante, mientras que el producto 22 en el que se omitió perfectamente el exón 10 fue ligeramente menos abundante. Debido a que el empalme del exón 10 del alelo 1 no se ve afectado y puede representar el 50 % del producto de tipo silvestre, este resultado sugiere que el alelo 2 también tiene un empalme defectuoso de tipo silvestre similar al alelo 1.

Cuantificación mediante análisis por qPCR interno del exón

La cuantificación de la expresión de ARNm de cada exón reveló que todos los exones, excepto los exones 8 y 10, mostraron una abundancia ~2 veces mayor en comparación con el control sano. Los exones 8 y 10 se expresaron a niveles 2 veces más bajos con respecto a los otros exones pero aún al 80-120 % de los niveles del control sano. Esto indica una expresión de ARNm anormalmente alta en este paciente. El alelo 1 (1256A>T) sufre una omisión parcial del exón 8, lo que da como resultado una falla en la detección de un producto de qPCR. Por lo tanto, la detección residual del exón 8 se deriva del alelo 2 (c.1551+1G>T), se espera que contribuya con el 50 %, y la expresión restante probablemente se deriva del empalme defectuoso de tipo silvestre del alelo 1. El mismo razonamiento se aplica a la detección del exón 10. En este caso, la expresión fue cercana al 50 % en relación con otros exones, lo que sugiere que la mutación c.1551+1G>T permitió niveles mucho más bajos de empalme de tipo silvestre. Cabe señalar que no está claro por qué este paciente muestra una expresión de GAA dos veces mayor en relación con el control sano, y si este aumento se aplica a ambos alelos en grados similares. Este paciente tiene un inicio de la enfermedad en la niñez/juvenil, pero está claramente menos afectado en comparación con los pacientes infantiles clásicos de Pompe, en consonancia con los bajos niveles de expresión residual de tipo silvestre de GAA (Tabla 1).

En resumen, el paciente 8 contenía dos mutaciones de empalme. c.1256A>T es una mutación de sentido erróneo en el exón 8 que causa p.Asp419Val y además genera un nuevo sitio donante de empalme en c.1254, lo que da como resultado una omisión parcial del exón 8 y un empalme defectuoso de tipo silvestre. c.1551+1G>T está ubicado en el intrón 10 y provoca la omisión perfecta del exón 10 y en el empalme defectuoso de tipo silvestre. El inicio infantil/juvenil de la enfermedad de Pompe sugiere que ambas mutaciones son patogénicas de moderadas a graves. Esto es consistente con los niveles de actividad de la enzima GAA, que son más bajos en comparación con los pacientes con inicio adulto.

La mucopolisacaridosis tipo VI (síndrome de Maroteaux-Lamy) es un trastorno monogénico recesivo autosómico causado por defectos en el gen que codifica la N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa (arilsulfatasa B; ARSB). Para demostrar la naturaleza genérica del ensayo de empalme, el ensayo se adaptó para MPSVI. Con este fin, se diseñaron cebadores de exones laterales para todos los exones codificantes del gen ARSB (exones 2-7; el primer y el último exón no pueden estar flanqueados). Se utilizaron las siguientes secuencias de cebadores y los tamaños de producto esperados (columna "tamaño de producto de tipo silvestre"):

Exón	Cebador	SEQ ID NO:	Producto de tipo silvestre	1142+2T>C
2	GGGTGCTCCTGGACAACTAC directo	1590	378	378
	CCTGTTGCAACTTCTTCGCC inverso	1591		
3	ATGGCACCTGGGAATGTACC directo	1592	444	444
	GTTGTTGTTCCAGAGCCCACT inverso	1593		
4	ACGCTCTGAATGTCACACGA directo	1594	514	514
	GTTGGCAGCCAGTCAGAGAT inverso	1595		
5	AAAAAGCAGTGGGCTCTGGA directo	1596	361	117
	CGGTGAAGAGTCCACGAAGT inverso	1597		
6	CAGAAGGGCGTGAAGAACCG directo	1598	314	314
	CCCCGTGAGGAGTTTCCAATTTC inverso	1599		
7	ACTTCGTGGACTCTTCACCG directo	1600	348	348
	AGTACACGGGGACTGAGTGT inverso	1601		

Se cultivaron fibroblastos primarios de un control sano, se recogió el ARN total, se sintetizó el ADNc y se amplificaron los exones 2-7 mediante PCR, véase la Figura 34. Los productos se separaron en un gel de agarosa y se visualizaron usando bromuro de etidio. La Figura 34 muestra que todos los exones produjeron una banda única predominante en el tamaño esperado (los marcadores de tamaño se indican a la izquierda y los números se refieren a los tamaños en pb). A continuación, se cultivaron fibroblastos de un paciente homocigoto para la variante ARSB c.1142+2T>C. Este paciente ha sido descrito previamente en Brands et al., (Orphanet J Rare Dis. 4 de abril de 2013; 8: 51). Si bien se sospechaba un defecto de empalme, no se ha demostrado. Además, no se sabía qué tan grave podría ser el posible

defecto de empalme. La aplicación del ensayo de empalme para analizar la naturaleza de esta variante reveló un grave defecto de empalme con dos resultados principales, como se muestra en la Figura 35, parte izquierda: 1) El producto de amplificación del exón 5 fue menor en comparación con el control sano: ahora se obtuvo un solo producto de 117 pb en lugar de 361 pb, lo que es consistente con una omisión del exón 5 y una eliminación de 244 nucleótidos en el ARNm, véase más arriba, todos los productos tenían una menor abundancia en comparación con el control sano. Esto es consistente con la idea de que la eliminación de 244 nucleótidos da como resultado un cambio en el marco de lectura, lo que resulta en la activación de la ruta de descomposición mediada sin sentido y la degradación del ARNm. Curiosamente, no se pudo detectar ningún empalme defectuoso de tipo silvestre. Esto es consistente con la progresión severa y rápida de la enfermedad en este paciente como se describe en Brands et al., (Orphanet J Rare Dis. 4 de abril de 2013; 8: 51). En conjunto, el ensayo de expresión y empalme se aplicó con éxito a MPSVI, lo que resultó en la identificación del defecto de empalme causado por la variante ARSB c.1142+2T>C. La ausencia de empalmes defectuosos de tipo silvestre fue consistente con el fenotipo severo del paciente involucrado.

Ejemplo 2

1. Generación del vector antisentido de ARNnp SF-U7

El gen ARNnp de U7 con promotor se obtuvo a partir de ADN genómico de ratón hembra utilizando cebadores GCGC**ctgcag**TAACAACATAGGAGCTGTG directo (SEQ ID NO: 1602) y GCGC**gtcgac**CAGATACGCGTTTCCTAG GA inverso (SEQ ID NO: 1603) con saliente PstI y SalI (indicados en negrita con tipo de letra regular) en una amplificación por PCR. La reacción PCR completa se cargó en un gel al 1 % y el fragmento de PCR (425 pb) se clonó en un vector Topo-II de acuerdo con el manual del fabricante (Invitrogen). Los sitios SMopt y StuI se generaron usando mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con un diseño de cebador interno y externo con GCTCTTTTAGAATT TTTGGAGCAGGTTTTTCTGACTTCG directo (SEQ ID NO: 1604) y ARNnp de U7-SmOPT inverso (CGAAGTCA GAAAACCTGCTCCAAAAATTCTAAAAGAGC (SEQ ID NO: 1605)) o CCTGGCTCGCTACAGAGGCCTTTCCG CAAGTGTTACAGC directo (SEQ ID NO: 1606) y Rv-U7ARNnp_StuI (GCTGTAACACTTGCGGAAAGCGCTCTG TAGCGAGCCAGG (SEQ ID NO: 1607)) como cebadores internos y con M13 directo (GTAAAACGACGGCCAG) (SEQ ID NO: 1608) y M13 inverso (CAGGAAACAGCTATGAC) (SEQ ID NO: 1609) como cebadores externos [Heckman, KL y LR Pease, Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nat Protoc, 2007. 2(4): páginas 924-32]. La secuencia de ARNnp de U7 modificada se clonó nuevamente en el vector pRRL.PPT.SF.pre [Warlich E et al., Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming. Mol Ther. Abril de 2011; 19 (4): 782-9] mediante el uso de sitios PstI y SalI y reemplazó al promotor SFFV original. Este es el procedimiento para generar el vector SF_U7ARNnp.

2. Optimización del vector antisentido SF_U7ARNnp para cribado de alto rendimiento

El sitio StuI usado originalmente no es único en el vector lentiviral de Warlich et al., y fue reemplazado por un sitio de restricción NsiI por mutagénesis dirigida al sitio usando los cebadores cctggctcgctacagatgcaTaggaggacggaggacg directo (SEQ ID NO: 1610) y cgtcctccgtcctcctAtgcatctgtagcgagccagg inverso (SEQ ID NO: 1611). Las letras mayúsculas indican residuos mutados.

3. Inserción de secuencias antisentido

Se insertaron nuevas secuencias antisentido con una PCR con cebador de secuencia sobresaliente mediante el uso de cebadores directos con secuencias sobresalientes que contienen las secuencias antisentido deseadas (gcgc**ATGCAT**-secuencia antisentido-ttggagcagg) (SEQ ID NO:1612). Las letras mayúsculas en negrita indican el sitio de restricción NsiI. El cebador inverso Rv_ms_U7ARNnp_SalI es (GCGCgtcgacCAGATACGCGTTTCCTAGGA) (SEQ ID NO: 1613) y fue el mismo para cada constructo, las letras minúsculas indican el sitio de restricción de SalI. La PCR con cebador de secuencia sobresaliente se realizó en el vector modificado (SF_U7ARNnp_NSI) usando PfuUltra HF (Agilent Technologies). El programa de PCR consistió en una etapa de desnaturalización inicial de 30 segundos a 95 °C, 35 ciclos a 95 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 10 segundos. La etapa de extensión final fue a 72 °C durante 10 minutos. La reacción de PCR que contenía la secuencia antisentido deseada y el ARNnp de U7 se cargó en un gel de agarosa al 2 % con tinción de bromuro de etidio al 0.2 %. Luego, las bandas se visualizaron bajo un transiluminador (UVP, LLC), se cortaron y se extrajeron con el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

Después de la extracción en gel, se digirieron 16 µl del producto purificado con SalI y NsiI (Roche) durante 1 hora a 37 °C y se purificaron con el kit de purificación PCR QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

Mientras tanto, el vector original se digirió con SalI y NsiI durante 1 hora a 37 °C, dando como resultado un vector sin secuencia antisentido. El vector digerido se cargó en un gel de agarosa al 1 % con tinción con bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron bajo un transiluminador y la banda correspondiente al vector digerido (6358 pb) se cortó y purificó utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania).

El vector digerido purificado y los productos PCR digeridos se ligaron con ADN ligasa T4 con ATP (New England BioLabs) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Los productos de ligación se transformaron en *E. coli* (TOP10) y se inocularon en placas de agar LB que contenían 100 µg/ml de ampicilina (Sigma). Después de la incubación durante la noche, se recogieron tres colonias por producto de ligación para cultivos miniprep. Las colonias recogidas se cultivaron durante la noche en 2 ml de LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina a 37 °C. La purificación de los plásmidos se llevó a cabo utilizando el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Después de la extracción, se midió la concentración de ADN con el espectrofotómetro Nanovue.

Las secuencias de los constructos recién generados se validaron con el secuenciador Sanger utilizando BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) para la reacción de secuencia y luego se purificaron con Sephadex G-50 (Sigma) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Las secuencias SEQ ID NOs: 41-97 son compuestos antisentido identificados con el cribado U7. La secuencia antisentido anterior se representa como ADN tal como se clona en un vector; sin embargo, en la célula se transcribe como una molécula de ARN. El experto sabe entonces que T es U.

La Figura 22 muestra ejemplos de posiciones de secuencias antisentido dirigidas a GAA para el cribado imparcial del intrón 1 y el exón 2.

Ensayo de actividad de la enzima

La actividad de la enzima se midió utilizando el ensayo de 4-metilumbeliferona. Las muestras se recogieron después de doce días de transducción. El tampón de lisis consistía en Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 100 mM, NaF 50 mM, Tx-100 al 1 % y una tableta de inhibidor de proteasa con EDTA (Roche). El tampón de lisis se incubó en fibroblastos transducidos durante 5 minutos en hielo antes de la recolección. Las muestras se usaron directamente o se congelaron instantáneamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C. De lo contrario, las muestras se mantuvieron en hielo para su uso posterior en el ensayo de 4-metilumbeliferona.

La actividad de GAA se midió utilizando el sustrato 4-metilumbeliferil-α-D-glucopiranósido, que es de naturaleza fluorogénica. Las concentraciones de proteínas de las muestras se determinaron mediante el método de proteínas de Lowry utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce, Thermo Scientific). Los estándares de albúmina de suero bovino (BSA) consistieron en 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.6, 1.0, 2.0 mg/ml. La absorbancia se midió a 562 nm para el ensayo de proteína BCA, y para el ensayo de 4-metilumbeliferona, la excitación fue a 365 nm y la emisión a 448 nm, utilizando el lector de microplacas Varioskan (Thermo Scientific). La actividad de la enzima GAA se expresó como nanomoles de sustrato hidrolizado por hora por miligramo de proteína total.

Producción de vectores lentivirales

Para la producción de vectores lentivirales, se sembraron células 293T con un crecimiento confluente del 90 % en placas de cultivo de 10 cm 1/8 sobre placas de cultivo de 10 cm. Después de 16-24 horas, se cotransfectaron un total de 3 µg de constructo de ARNnp de U7, 2 µg de Pax2 y 1 µg de VSV utilizando el agente de transfección Fugene 6 (Promega). Los sobrenadantes virales (9 ml) se recolectaron 72 horas después de la transfección, se filtraron sobre filtros de 0.45 µm (MillexHV, Millipore) y se concentraron por ultracentrifugación en una ultracentrífuga Beckman (Beckman Coulter) a 20.000 rpm, 4 °C durante 2 horas. Los sedimentos virales se resuspendieron en 100 µl de medio Eagle modificado de Dulbecco con bajo en glucosa (Gibco, Paisley, RU), se dividieron en alícuotas en criotubos (Thermo Scientific) y se almacenaron a -80 °C. Los títulos lentivirales se determinaron después de la concentración mediante ultracentrifugación con el kit ELISA de antígeno p24 del VIH (Retrotek, ZeptroMetrix Corporation). El ensayo se midió con un lector de microplacas Varioskan (Thermo Scientific).

Transducción de células

Los medios de cultivo se reemplazaron con nuevos medios de cultivo que contenían 6 ng/ml de sulfato de protamina (Sigma) 24 horas después de la siembra. Las células se transdujeron con títulos iguales de lentivirus (véase más arriba).

Se transdujeron fibroblastos primarios del paciente, véase más arriba con lentivirus que contenían el constructo de AON de ARNnp de U7 y se permitió que se produjera el empalme. El cribado de fibroblastos se realizó mediante la infección de pocillos individuales que contenían fibroblastos primarios con lentivirus que expresaban un solo tipo de AON de ARNnp de U7. El ARN se analizó 5 días después de la infección. Los productos de empalme se analizaron con RT-qPCR. La actividad de la enzima GAA se analizó 12 días después de la infección (véase más arriba: ensayo de actividad de la enzima). La Figura 19 muestra cambios en la inclusión del exón 2 por diferentes AON. Análisis de expresión de ARN usando RT-qPCR de un cribado en el intrón 1 y el exón 2 de GAA con secuencias antisentido con el uso del sistema de ARN nuclear pequeño de U7. Los números indican las posiciones de la secuencia antisentido de acuerdo con la Tabla 1. El control es el fibroblasto del paciente sin vector AON añadido.

La Figura 20 muestra el análisis de ARN con RT-PCR de un cribado en el intrón 1 y el exón 2 de GAA con secuencias antisentido utilizadas en el sistema de ARN nuclear pequeño de U7. Los números indican las posiciones de la secuencia antisentido de acuerdo con la Tabla 1. En la RT-PCR de GAA, se observan tres productos principales. El producto superior representa la inclusión del exón 2, el doblete inferior representa la omisión parcial del exón 2 (banda

superior del doblete) y la omisión completa del exón 2 (banda inferior del doblete). Se usó RT-PCR de beta-actina como control de carga.

La Figura 21 muestra la actividad de la enzima GAA del cribado en el intrón 1 y el exón 2 de GAA con secuencias antisentido en el sistema de ARN nuclear pequeño de U7. Los números indican las posiciones de la secuencia antisentido de acuerdo con la Tabla 1. El control es el fibroblasto del paciente sin vector de AON añadido.

Está claro que algunos clones aumentan significativamente la inclusión del exón 2 y, por lo tanto, proporcionan candidatos potenciales para una terapia para pacientes de Pompe que tienen la mutación IVS1. La Figura 23 muestra un ejemplo que ilustra que la secuencia identificada no se pudo predecir ya que la secuencia identificada se identificó tanto como motivo potenciador como silenciador.

Ejemplo 3

Con mucho, la mutación más común que causa la enfermedad de Pompe es la mutación c.-32-13T>G (IVS1). Esta mutación en el gen de GAA se encuentra en un intrón 13 pares de bases secuencia arriba del exón 2, el exón que contiene el codón de inicio para la traducción del ARNm de GAA. La mutación IVS1 provoca errores de empalme del exón 2 en aproximadamente el 90 % de los transcritos de GAA porque interrumpe el tracto de polipirimidina, lo que reduce la fuerza del sitio aceptor de empalme del exón 2.

Para contrarrestar esta fuerza reducida del sitio de empalme, se quiso identificar secuencias que se unen a factores de empalme que tienen un efecto negativo en el empalme del exón 2 de GAA. Mediante la integración de mutaciones aleatorias en y alrededor del exón 2, se podrían encontrar estas secuencias.

Para el cribado rápido de una gran cantidad de mutaciones, se generó un minigen que contenía el exón 1, el intrón 1, el exón 2, el intrón 2, el exón 3 y una parte del intrón 3 de GAA (Figura 24, parte 1). Mediante la integración de 2 sitios de restricción únicos, se puede intercambiar rápidamente parte del minigen que rodea al exón 2 con secuencias mutantes (Figura 24, parte 2). Se lleva a cabo una PCR en condiciones subóptimas para integrar mutaciones aleatorias en los productos de la PCR (Figura 24, parte 3). Estos productos de PCR, que también contienen los sitios de restricción ubicados alrededor del exón 2, se pueden ligar directamente en el vector de destino. Después de la transformación de los productos ligados, los clones pueden seleccionarse y el plásmido puede aislarse del clon, que contiene una mutación aleatoria (Figura 24, parte 4). La transfección separada de estos clones en células HEK293 genera transcritos de ARN del minigen de GAA que da como resultado un empalme diferencial en comparación con el control. En la Figura 24, parte 5 se muestra un ejemplo, en la que se realizó una RT-PCR del exón lateral y una qPCR interna del exón contra el ADNc generado a partir de 3 clones (indicados en la Figura 24, parte 5). La secuenciación de los plásmidos que producen una mayor inclusión del exón 2 da como resultado la identificación de una secuencia importante que influye negativamente en el empalme. Estas secuencias se pueden usar secuencialmente para probar como un objetivo potencial para la terapia antisentido o para cribar compuestos que se unen a esta área.

La Figura 25 proporciona los resultados de dos de los clones. El clon 115 y el clon 97 demuestran un aumento del 118 % y del 297 % en la inclusión del exón 2, respectivamente, en comparación con la mutación IVS1. El clon 115 contiene las mutaciones: c.17C>T, c.469C>T y c.546+23C>A. Da como resultado un mayor empalme de tipo silvestre (banda 1) y una disminución de la omisión perfecta (banda 3). El clon 97 contiene las mutaciones: c.-32-102T>C, c.-32-56C>T, c.11G>A, c.112G>A y c.137C>T. Este clon también pierde c.-32-553 a c.-32-122, sin embargo, esto no afecta la exclusión del exón 2 (de acuerdo con lo determinado por nosotros al comparar el empalme de constructos de minigenes que contienen o no esta región). El empalme de tipo silvestre (banda 3) aumenta considerablemente, mientras que tanto la omisión parcial (banda 2) como la perfecta (banda 3) disminuyen.

Además del minigen para el exón 1-exón 3, también se generó un minigen que contiene la región genómica del exón 5 de GAA al exón 8 de GAA. Con este minigen se pudieron probar otras mutaciones que influyen en el empalme de forma muy parecida a la mutación IVS1.

La Fig. 36 muestra el resultado de la inhibición de la vía de descomposición mediada sin sentido (NMD) tras la inclusión del intrón 6 del ARNm de GAA. Se realizó un tratamiento con ciclohexamida de fibroblastos primarios de un control sano (gel superior), un paciente con Pompe con el genotipo c.-32-13T>G, c.525delT (gel medio) y un paciente con Pompe con el genotipo c.525delT, c.525delT (gel inferior). Sin inhibición de la vía NMD (carriles marcados con 0 h), se detectó una banda fuerte mediante RT-PCR que representa el empalme canónico del exón 6 y el exón 7. Se observó una banda tenue justo por encima de la banda canónica. Esta banda se determinó mediante análisis de secuencia de ADN para representar la inclusión del intrón 6. Debido a que dicho producto cambia el marco de lectura que resulta en la activación de la vía NMD, se especula que la inclusión del intrón 6 puede ser, de hecho, un evento frecuente que escapa a la detección adecuada. Esta idea fue confirmada por la inhibición de la vía NMD: esto dio como resultado la detección de una banda fuerte que representaba la inclusión del intrón 6. Esto indicó que muchas especies de pre-ARNm de GAA escapan al empalme canónico tanto en controles sanos como en pacientes con Pompe. El minigen que contiene el exón 5-8 de GAA mencionados anteriormente y el cribado de ARNnp de U7 se usarán para identificar secuencias que pueden evitar la inclusión del intrón 6 en el ARNm final mediante el bloqueo de un represor del empalme del exón 6/7. Esto representaría una terapia genérica para todas las mutaciones de empalme con empalme

defectuoso de tipo silvestre que causa la enfermedad de Pompe, porque se mejorará el empalme correcto de los exones 6/7, mejorando así también los niveles de empalme defectuoso de tipo silvestre.

Las siguientes mutaciones producen una mayor expresión de ARN: c.17C>T, c.469C>T y c.546+23C>A, c.-32-102T>C, c.-32-56C>T, c.11G>A, c.112G>A y c.137C>T. Los AON que se dirigen a las secuencias de ARNm en las que se encuentran estas mutaciones pueden ser útiles para el tratamiento de pacientes. Las SEQ ID NOs: 98-540 son ejemplos de secuencias encontradas con el enfoque del minigen. La Tabla anterior muestra las SEQ ID NOs: 98-540 y la mutación o secuencia genómica a la que se dirige.

La Figura 26 muestra una curva de respuesta a la dosis para la SEQ ID NO: 12 (AON 1) (paneles superiores) y la SEQ ID NO: 33 (AON 2) (paneles inferiores). Los fibroblastos derivados de pacientes con el genotipo c.-32-13T>G (IVS1) en un alelo y c.525delT en el otro alelo no se trataron ('sin transfección') o se incubaron con un compuesto oligomérico antisentido a 0-20 μM. Téngase en cuenta que el c.525delT sufre una descomposición mediada sin sentido, lo que explica por qué los efectos a nivel de ARN se derivan principalmente del alelo IVS1. Las células se recolectaron para análisis de ARN después de 3 días (A, C) y para análisis de proteínas después de 5 días (B, D). Ambas la SEQ ID NO: 12 (AON 1) y la SEQ ID NO: 33 (AON 2) se unen a una secuencia presente en el intrón 1 del pre-ARNm de GAA, que se identificó mediante el ensayo de ARNnp de U7. Esto da como resultado la promoción de la inclusión del exón 2, lo que produce una mayor expresión de ARNm de GAA de tipo silvestre. Esto se mide a nivel de ARNm (usando cebadores que detectan específicamente GAA de tipo silvestre) y a nivel de proteína (usando un ensayo para la actividad enzimática de GAA).

Análisis de ARN: se aisló el ARN total, se sintetizó el ADNc y se realizó un análisis de RT-qPCR para detectar la inclusión del exón 2 de GAA (utilizando un cebador directo específico para el exón 1 y un cebador inverso específico para el exón 2).

Análisis de proteínas: La actividad de la enzima GAA se midió utilizando el ensayo 4-MU. Las actividades se normalizaron para la proteína total medida usando el ensayo BCA.

Tratamiento de compuestos oligoméricos antisentido: Los compuestos oligoméricos antisentido usados en el presente documento son morfolinos obtenidos a partir de herramientas genéticas. El compuesto oligomérico antisentido se transfectó en las células utilizando Endo-Porter (Gene Tools) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Este siguiente experimento es similar al de la línea 1 de fibroblastos del paciente (Figura 26) y sirvió para demostrar que los compuestos oligoméricos antisentido también funcionan en una línea celular 2 independiente de otro paciente. En este caso, el genotipo era IVS1 en un alelo y una variante de sentido erróneo (c.923A>C) en el otro alelo. Téngase en cuenta que el alelo c.923A>C no sufre una descomposición mediada sin sentido y los niveles de ARNm representan una mezcla de ambos alelos, lo que hace que los efectos en el alelo IVS1 sean menos pronunciados en comparación con el paciente 1. La Figura 27 muestra una curva de respuesta a la dosis para la SEQ ID NO: 12 (AON 1) (paneles superiores) y la SEQ ID NO: 33 (AON 2) (paneles inferiores).

La Figura 28 muestra la especificidad de los compuestos oligoméricos antisentido de la SEQ ID NO: 12 (AON 1) y la SEQ ID NO: 33 (AON 2) para promover la inclusión del exón 2.

La SEQ ID NO: 35 (AON 2 de control) y la SEQ ID NO: 36 (AON 3 de control) se refieren a otra región en el intrón 1 de GAA pero es ineficaz para promover la inclusión del exón 2. Un AON no relacionado dirigido al ARNm de CypA (AON 1 de control; SEQ ID NO: 34) no afecta la inclusión del exón 2 de GAA. La SEQ ID NO: 12 (AON 1) y la SEQ ID NO: 33 (AON 2) promueven de manera eficiente la inclusión del exón 2 de GAA como se muestra en el análisis de RT-qPCR (A) y el ensayo de actividad de la enzima GAA concomitante (B). Esto muestra que solo cuando la secuencia de silenciamiento de empalme intrónico (ISS) identificada en el ensayo de ARNnp de U7 es el objetivo, como con la SEQ ID NO: 12 (AON 1) y la SEQ ID NO: 33 (AON 2), se promueve la inclusión del exón 2 de GAA.

Número de secuencia	Gen objetivo	Secuencia en el ADNc con la cual se hibrida AON	secuencia del AON (5' -> 3'):	SEQ ID
AON 1 de control	CypA	c.354_362+11*	TGTACCCTTACCACTCAGTC	34
AON 2 de control	GAA	c.-32-224_-200**	GAGTGCAGAGCACTTGCACAGTCTG	35
AON 3 de control	GAA	c.-32-219_-200**	GAGTGCAGAGCACTTGCACAGTCTG	36
* La secuencia de ADNc de CypA es la entrada NM_021130.4 de Refseq ** La secuencia de ADNc de GAA es la entrada NM_000152.3 de Refseq				

La Figura 32 muestra el transcurso del tiempo del efecto de la SEQ ID NO: 33 (AON 2) en la línea 1 de fibroblastos del paciente. Se analizó la actividad de GAA en las células a los 3-7 días después de la adición del compuesto oligomérico antisentido. El compuesto oligomérico antisentido estuvo continuamente presente en el medio durante todo el experimento.

La figura muestra que el efecto sobre la actividad de GAA comienza después de 3 días y alcanza un máximo a los 5 días después de la adición del AON.

Referencias

1. Boycott, K.M., et al., Rare-disease genetics in the era of next-generation sequencing: discovery to translation. Nat Rev Genet, 2013. 14(10): p. 681-91.
2. Havens, M.A., D.M. Duelli, and M.L. Hastings, Targeting RNA splicing for disease therapy. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2013. 4(3): p. 247-66.
3. Desmet, F.O., et al., Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. Nucleic Acids Res, 2009. 37(9): p. e67.
4. Yeo, G. and C.B. Burge, Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. J Comput Biol, 2004. 11(2-3): p. 377-94.
5. Reese, M.G., et al., Improved splice site detection in Genie. J Comput Biol, 1997. 4(3): p. 311-23.
6. Pertea, M., X. Lin, and S.L. Salzberg, GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. Nucleic Acids Res, 2001. 29(5): p. 1185-90.
7. Palacios, I.M., Nonsense-mediated mRNA decay: from mechanistic insights to impacts on human health. Brief Funct Genomics, 2013. 12(1): p. 25-36.
8. van der Ploeg, A.T. and A.J. Reuser, Pompe's disease. Lancet, 2008. 372(9646): p. 1342-53.
9. Umapathysivam, K., J.J. Hopwood, and P.J. Meikle, Correlation of acid alpha-glucosidase and glycogen content in skin fibroblasts with age of onset in Pompe disease. Clin Chim Acta, 2005. 361(1-2): p. 191-8.
10. Van den Hout, H., et al., Recombinant human alpha-glucosidase from rabbit milk in Pompe patients. Lancet, 2000. 356(9227): p. 397-8.
11. Kishnani, P., et al., Enzyme replacement therapy with recombinant human acid alpha glucosidase (rhGAA) in infantile Pompe disease (IPD): Results from a Phase 2 study. Pediatric Research, 2003. 53(4): p. 259a-259a.
12. Kishnani, P.S., et al., Recombinant human acid alpha-glucosidase - Major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. Neurology, 2007. 68(2): p. 99-109.
13. Gungor, D., et al., Impact of enzyme replacement therapy on survival in adults with Pompe disease: results from a prospective international observational study. Orphanet Journal of Rare Diseases, 2013. 8.
14. den Dunnen, J.T. and S.E. Antonarakis, Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: A discussion. Human Mutation, 2000. 15(1): p. 7-12.
15. Butterworth, J. and D.M. Droadhead, Diagnosis of Pompe's disease in cultured skin fibroblasts and primary amniotic fluid cells using 4-methylumbelliferyl-alpha-D-glucopyranoside as substrate. Clin Chim Acta, 1977. 78(2): p. 335-42.
16. Pickrell, J.K., et al., Noisy splicing drives mRNA isoform diversity in human cells. PLoS Genet, 2010. 6(12): p. e1001236.
17. Huie, M.L., et al., Aberrant splicing in adult onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of an IVS1 (-13T-->G) mutation in a majority of patients and a novel IVS10 (+1GT->CT) mutation. Hum Mol Genet, 1994. 3(12): p. 2231-6.
18. Boerkoel, C.F., et al., Leaky splicing mutation in the acid maltase gene is associated with delayed onset of glycogenosis type II. Am J Hum Genet, 1995. 56(4): p. 887-97.
19. Pittis, M.G., et al., Molecular and functional characterization of eight novel GAA mutations in Italian infants with Pompe disease. Hum Mutat, 2008. 29(6): p. E27-36.
20. Dardis, A., et al., Functional characterization of the common c.-32-13T>G mutation of GAA gene: identification of potential therapeutic agents. Nucleic Acids Res, 2014. 42(2): p. 1291-302.
21. Hermans, M.M., et al., The effect of a single base pair deletion (delta T525) and a C1634T missense mutation (pro545leu) on the expression of lysosomal alpha-glucosidase in patients with glycogen storage disease type II. Hum Mol Genet, 1994. 3(12): p. 2213-8.
22. Hermans, M.M., et al., Twenty-two novel mutations in the lysosomal alpha-glucosidase gene (GAA) underscore the genotype-phenotype correlation in glycogen storage disease type II. Hum Mutat, 2004. 23(1): p. 47-56.
23. Orlikowski, D., et al., Recombinant human acid alpha-glucosidase (rhGAA) in adult patients with severe respiratory failure due to Pompe disease. Neuromuscul Disord, 2011. 21(7): p. 477-82.
24. Stroppiano, M., et al., Aberrant splicing at catalytic site as cause of infantile onset glycogen storage disease type II (GSDII): molecular identification of a novel IVS9 (+2GT-->GC) in combination with rare IVS10 (+1GT->CT). Am J Med Genet, 2001. 101(1): p. 55-8.
25. Muller-Felber, W., et al., Late onset Pompe disease: clinical and neurophysiological spectrum of 38 patients including long-term follow-up in 18 patients. Neuromuscul Disord, 2007. 17(9-10): p. 698-706.
26. Kroos, M., et al., Update of the pompe disease mutation database with 60 novel GAA sequence variants and additional studies on the functional effect of 34 previously reported variants. Hum Mutat, 2012. 33(8): p. 1161-5.
27. Kroos, M., et al., Seven cases of Pompe disease from Greece. J Inherit Metab Dis, 2006. 29(4): p. 556-63.
28. Barbosa-Morais, N.L., et al., The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. Science, 2012. 338(6114): p. 1587-93.
29. Wang, G.S. and T.A. Cooper, Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. Nat Rev Genet, 2007. 8(10): p. 749-61.
30. Kwan, T., et al., Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans. Nat Genet, 2008. 40(2): p. 225-31.

31. Castle, J.C., et al., Expression of 24,426 human alternative splicing events and predicted cis regulation in 48 tissues and cell lines. Nat Genet, 2008. 40(12): p. 1416-25.
32. Wang, E.T., et al., Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. Nature, 2008. 456(7221): p. 470-6.
33. Lappalainen, T., et al., Transcriptome and genome sequencing uncovers functional variation in humans. Nature, 2013. 501(7468): p. 506-11.
34. Lalonde, E., et al., RNA sequencing reveals the role of splicing polymorphisms in regulating human gene expression. Genome Res, 2011. 21(4): p. 545-54.
35. Wokke, J.H., et al., Genotype-phenotype correlation in adult-onset acid maltase deficiency. Ann Neurol, 1995. 38(3): p. 450-4.
36. Kishnani, P.S., et al., Cross-reactive immunologic material status affects treatment outcomes in Pompe disease infants. Mol Genet Metab, 2010. 99(1): p. 26-33.
37. Lim, K.H., et al., Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. Proc Natl Acad Sci USA, 2011. 108(27): p. 11093-8.
38. Fan, L., et al., Sudemycins, novel small molecule analogues of FR901464, induce alternative gene splicing. ACS Chem Biol, 2011. 6(6): p. 582-9.
39. Webb, T.R., A.S. Joyner, and P.M. Potter, The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer. Drug Discov Today, 2013. 18(1-2): p. 43-9.
40. Warlich, E., et al., Lentiviral vector design and imaging approaches to visualize the early stages of cellular reprogramming. Mol Ther, 2011. 19(4): p. 782-9.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto oligomérico antisentido dirigido a la SEQ ID NO: 1 y polimorfismo de un solo nucleótido de la SEQ ID NO: 1, en el que dicho compuesto oligomérico antisentido se:

- selecciona del grupo que consta de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, y secuencias que tienen al menos un 90 % de identidad de secuencia con las mismas en toda la longitud de las SEQ ID NOs: 10-17 o 33, o
- selecciona del grupo que consiste en secuencias más cortas de las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, con una longitud de al menos 15 nucleótidos consecutivos, o
- selecciona del grupo que consiste en secuencias más largas que comprenden una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 10-17 y 33, teniendo estas secuencias más largas una longitud máxima de 30 nucleótidos

2. Compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el compuesto oligomérico antisentido es la SEQ ID NO: 12 o la SEQ ID NO: 33, o secuencias que tienen al menos un 90 % de identidad con el mismo.

3. Compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que se modifica la base de uno o más nucleótidos.

4. Compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el azúcar de uno o más nucleótidos está modificado, preferiblemente la modificación del azúcar es 2'-O-metilo o 2'-O-metoxietilo.

5. Compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el compuesto oligomérico está uniformemente modificado.

6. Compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la cadena principal del compuesto oligomérico está modificada, preferiblemente es fosforotioatos de morfolino o fosforodiamidato de morfolino.

7. Compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para uso en el tratamiento de la enfermedad de Pompe.

8. Compuesto oligomérico antisentido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el tratamiento es un tratamiento de un paciente que comprende una mutación c.-32-13T>G en el gen humano que codifica la alfa glucosidasa ácida *(GAA).*

9. Compuesto oligomérico antisentido para uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el tratamiento comprende la inclusión del exón, preferiblemente la inclusión del exón 2.

10. Un método *in vitro* para modular el empalme de pre-ARNm de alfa glucosidasa ácida (GAA) en una célula que comprende: poner en contacto la célula con un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

11. Método *in vitro* para restaurar la función de la alfa glucosidasa ácida (GAA) en una célula en el que dicho método comprende la administración de un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

12. Método *in vitro* para corregir la expresión génica anormal en una célula, preferiblemente una célula muscular, comprendiendo el método administrar a dicha célula un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6.

13. Método *in vitro* de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que el compuesto oligomérico antisentido es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 6, preferiblemente en el que la célula comprende al menos una mutación seleccionada del grupo c.-32-13T>G, c.-32-3C>G, c.547-6, c.1071, c.1254 y c.1552-30 en el gen humano que codifica la alfa glucosidasa ácida (*GAA*), más preferiblemente en el que la célula comprende la mutación c.-32-3C>G o c.-32-13T>G.

14. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-13, en el que se logra la inclusión del exón, preferiblemente la inclusión del exón 2.

15. Una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto oligomérico antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, preferiblemente en la que dicha composición comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un agente de administración celular.

Fig. 1

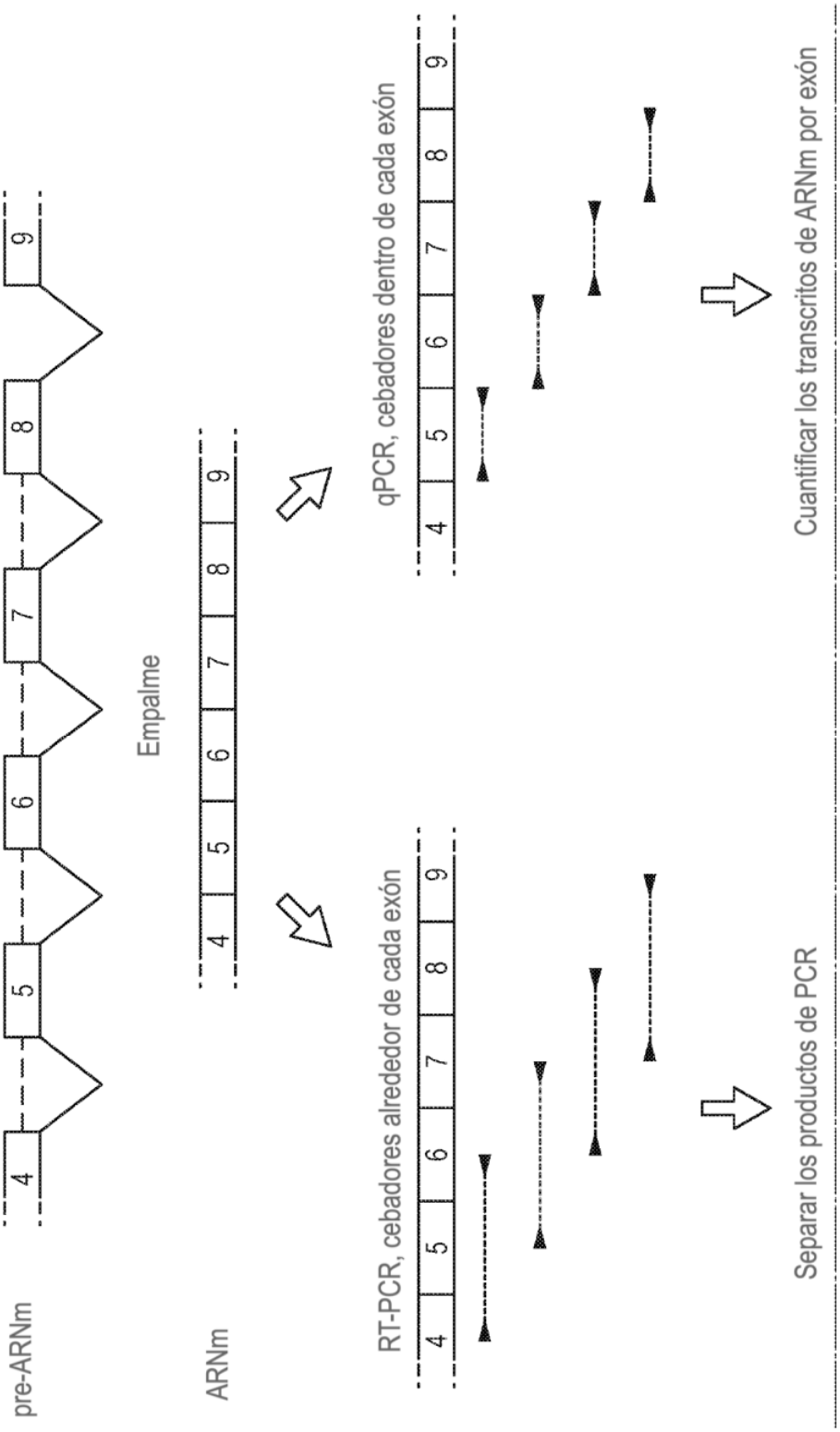

pre-ARNm
Empalme
ARNm
RT-PCR, cebadores alrededor de cada exón
qPCR, cebadores dentro de cada exón
Separar los productos de PCR
Cuantificar los transcritos de ARNm por exón

Fig. 1(Cont.)

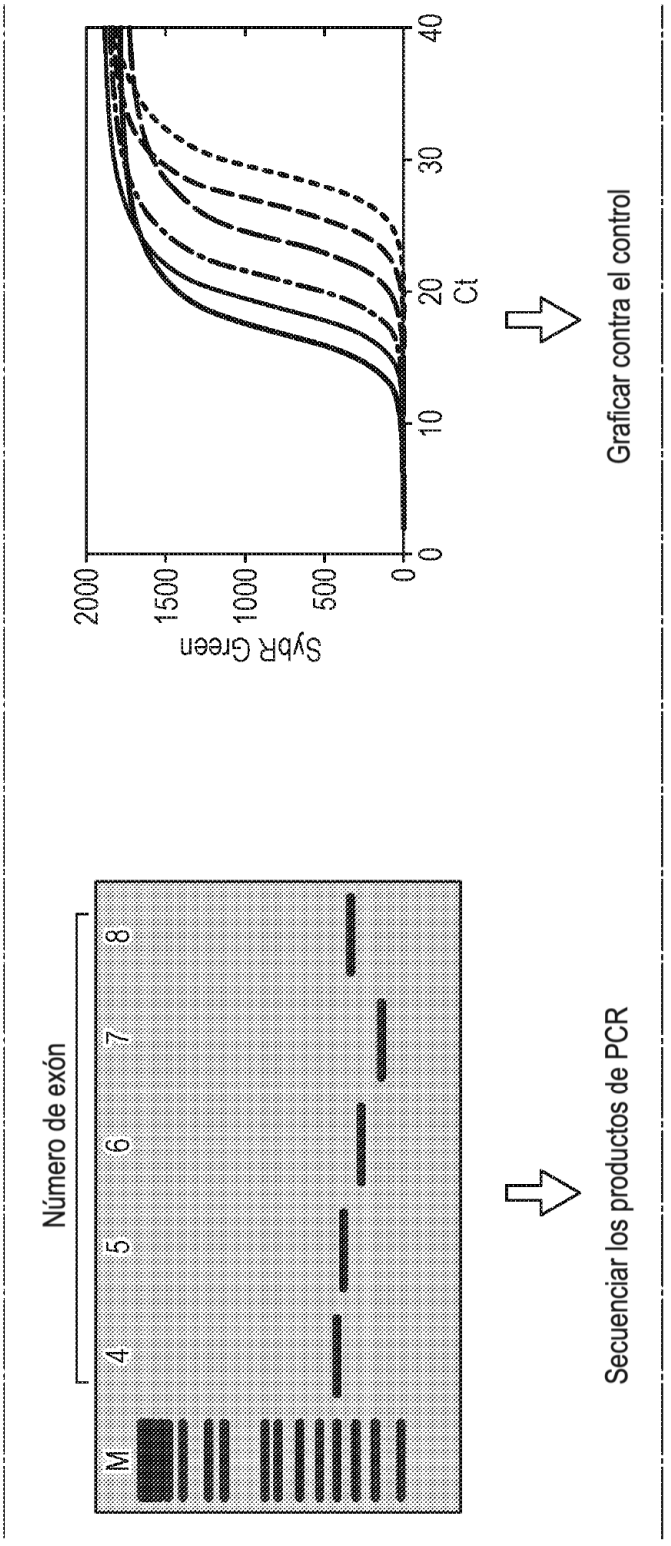

Número de exón
M
4
5
6
7
8
Secuenciar los productos de PCR
SybR Green
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
Ct
Graficar contra el control

Fig. 1(Cont. A)

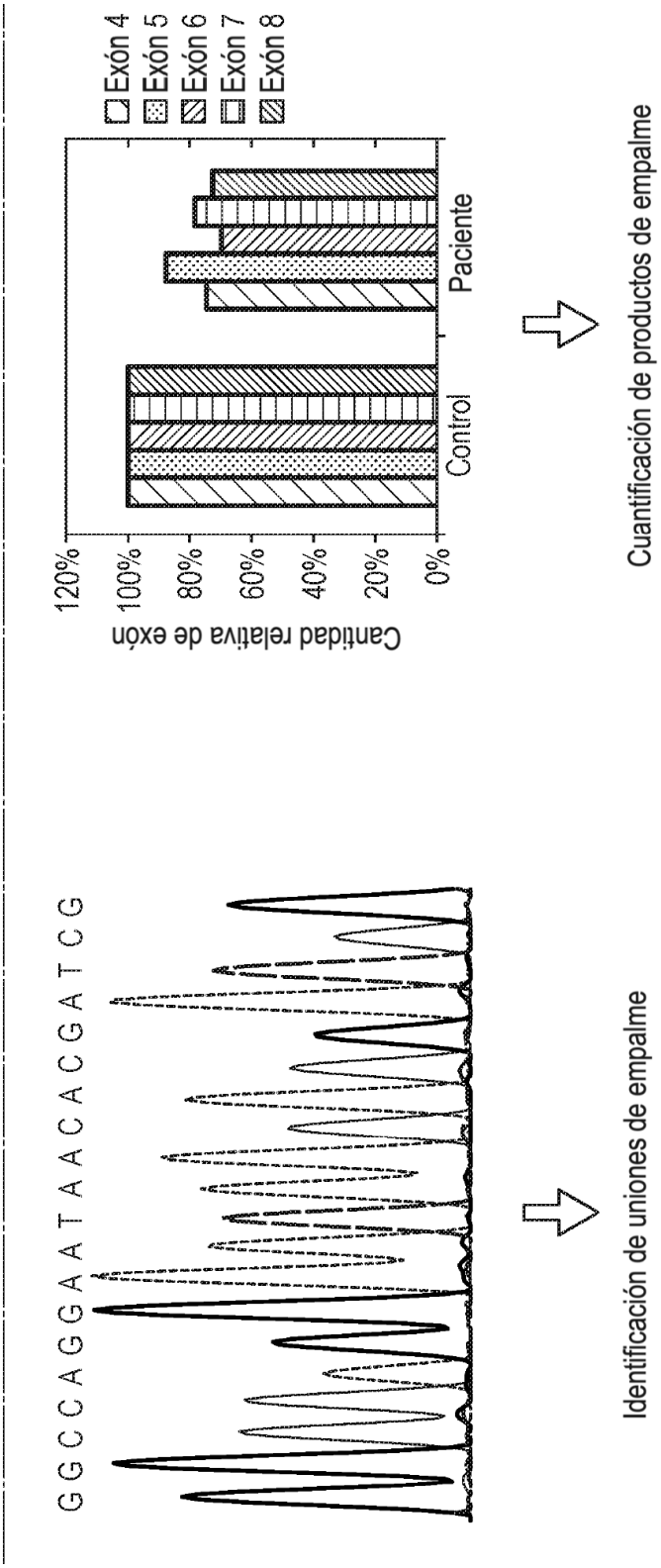

Exón 4
Exón 5
Exón 6
Exón 7
Exón 8
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Cantidad relativa de exón
Control
Paciente
Cuantificación de productos de empalme
G G C C A G G A A T A A C A C G A T C G
Identificación de uniones de empalme

Fig. 2A

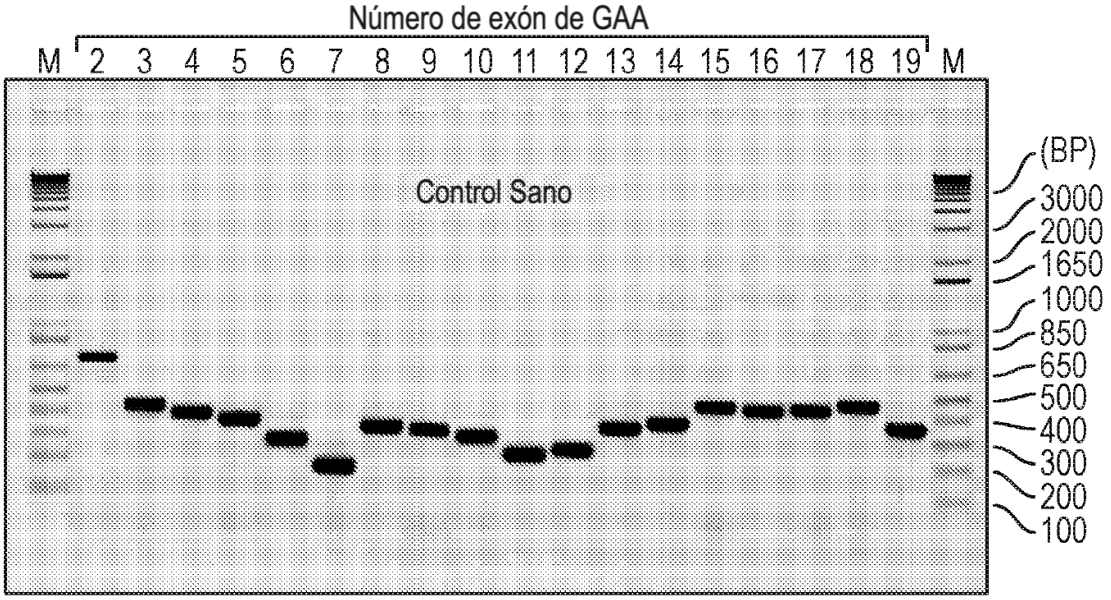

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Control Sano
(BP)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 2B

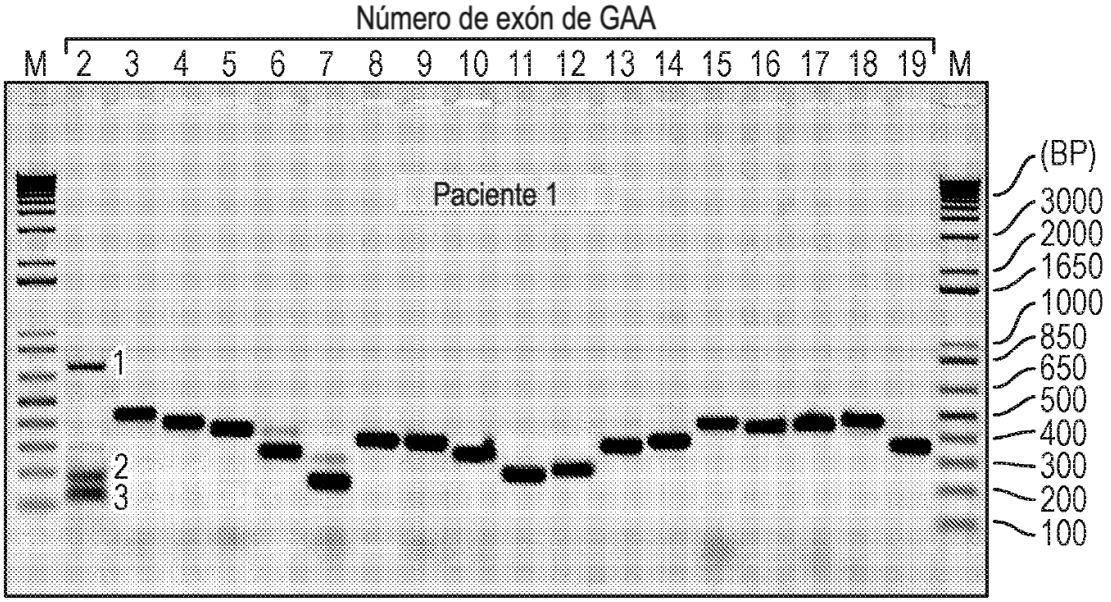

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 1
1
2
3
(BP)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 2C

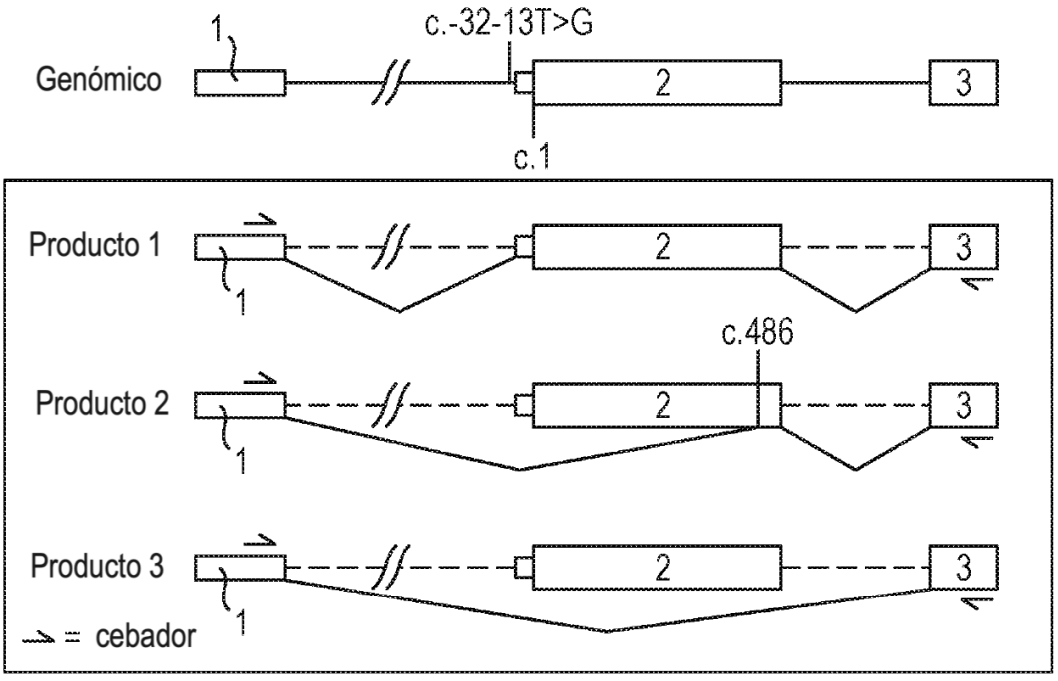

Genómico
1
c.-32-13T>G
2
3
c.1
Producto 1
Producto 2
Producto 3
c.486
= cebador

Fig. 2D

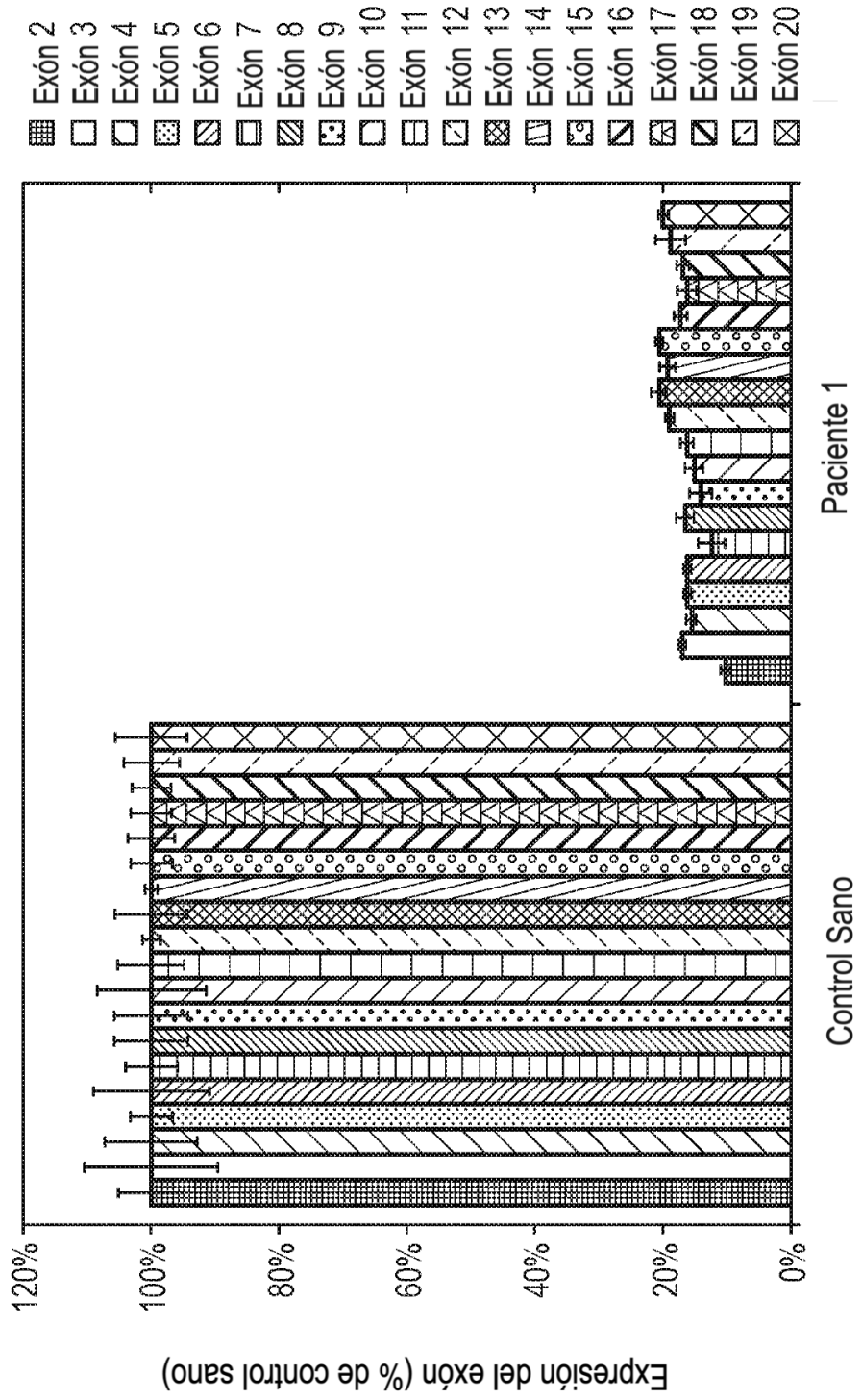

Exón 2
Exón 3
Exón 4
Exón 5
Exón 6
Exón 7
Exón 8
Exón 9
Exón 10
Exón 11
Exón 12
Exón 13
Exón 14
Exón 15
Exón 16
Exón 17
Exón 18
Exón 19
Exón 20
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Expresión del exón (% de control sano)
Control Sano
Paciente 1

Fig. 3A

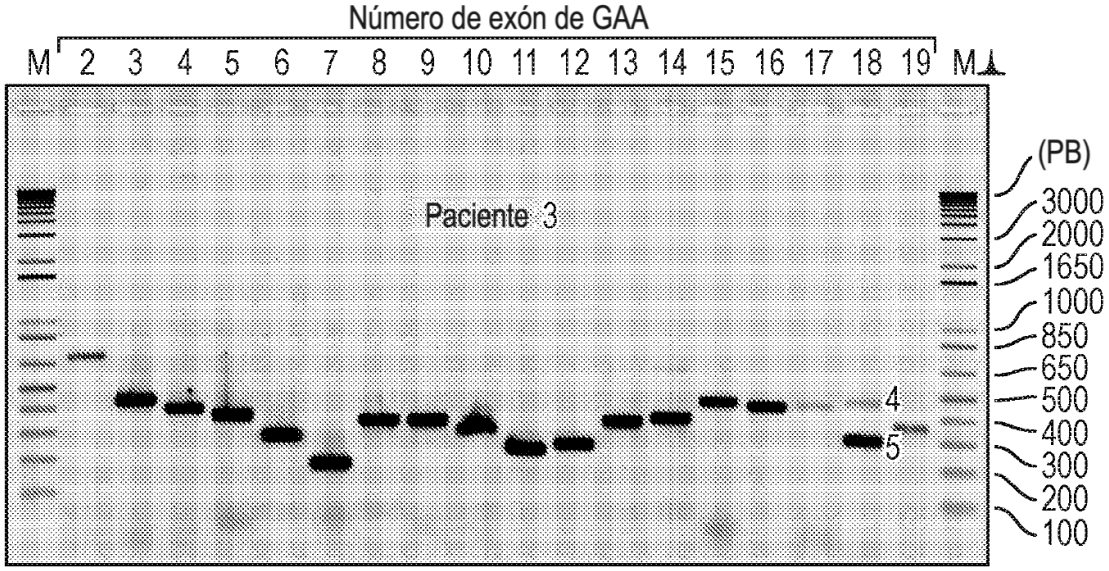

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 3
4
5
(PB)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 3B

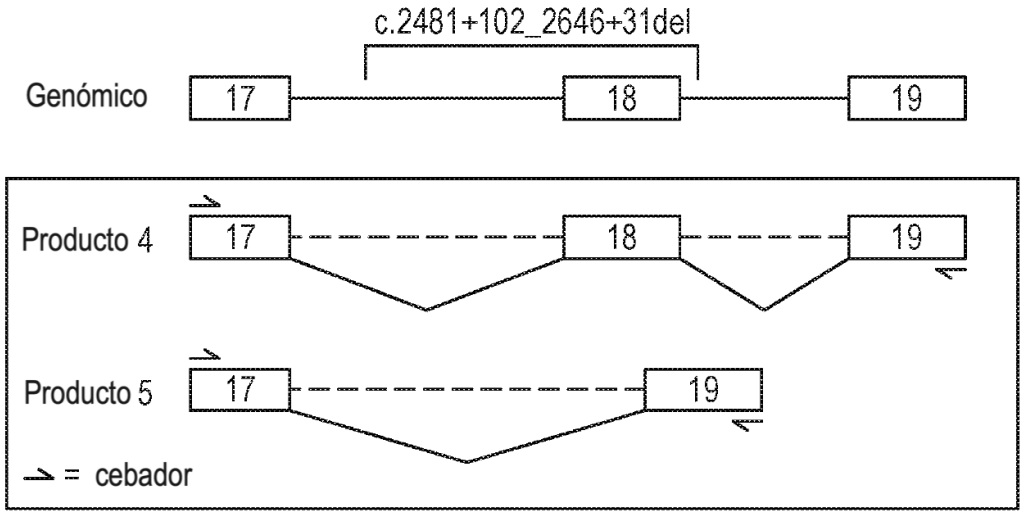

c.2481+102_2646+31del
Genómico
17
18
19
Producto 4
17
18
19
Producto 5
17
19
= cebador

Fig. 3C

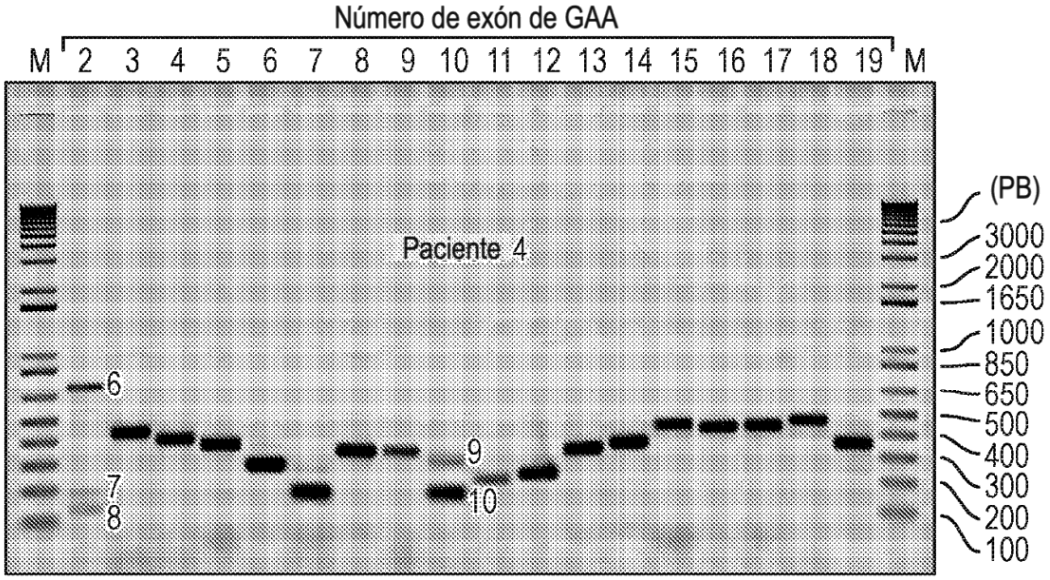

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 4
6
7
8
9
10
(PB)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 3D

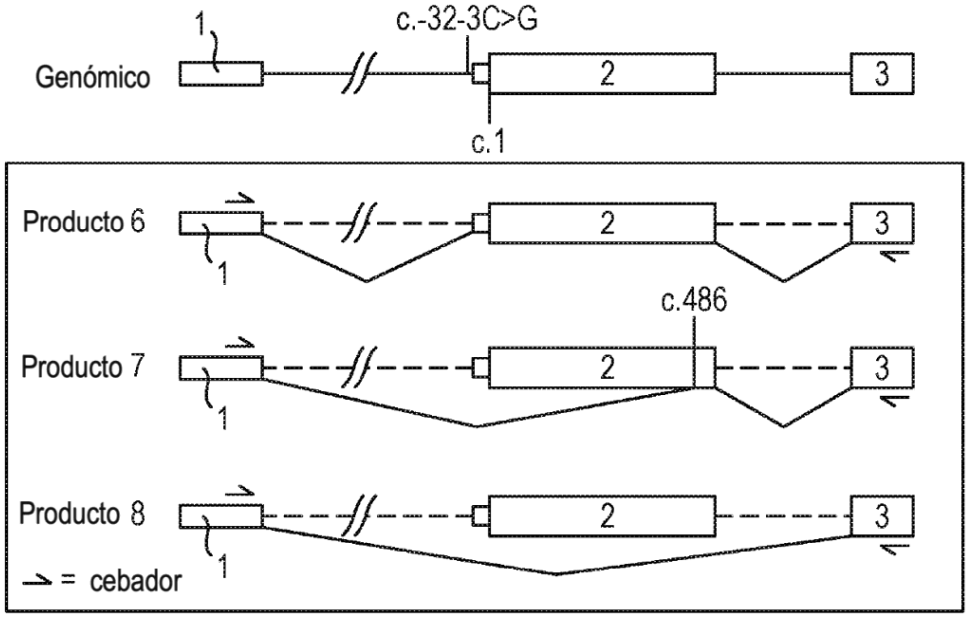

Genómico
1
c.-32-3C>G
2
3
c.1
Producto 6
Producto 7
c.486
Producto 8
= cebador

Fig. 3E

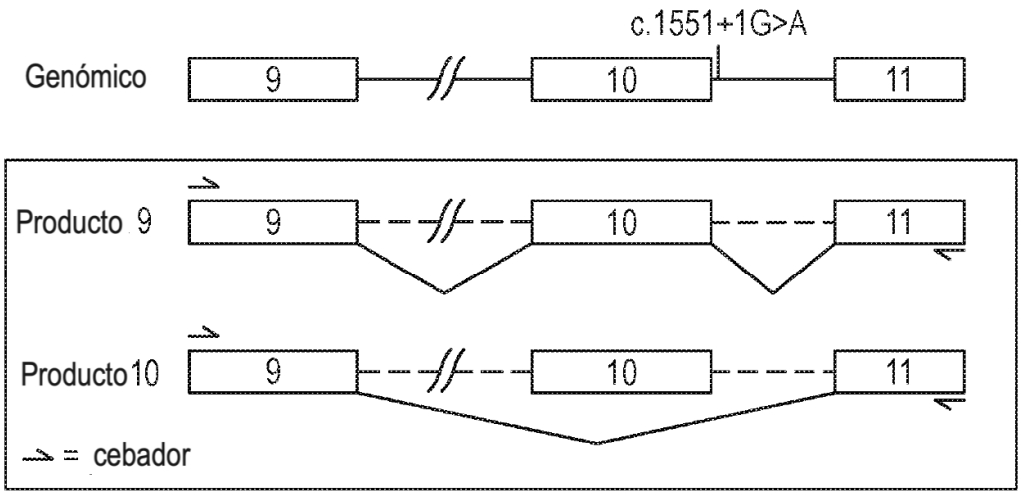

c.1551+1G>A
Genómico
9
10
11
Producto 9
9
10
11
Producto 10
9
10
11
= cebador

Fig. 3F

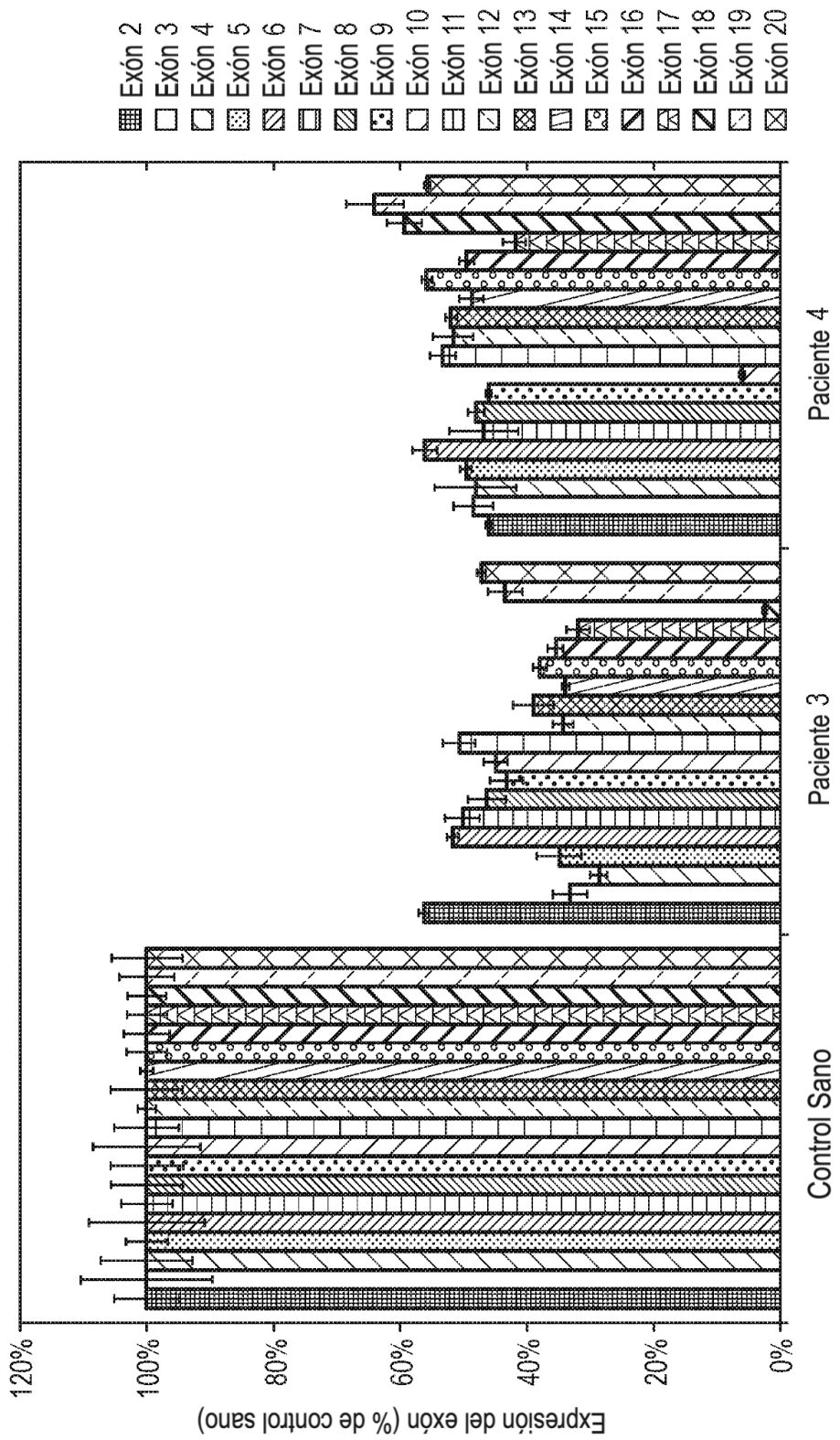

Exón 2
Exón 3
Exón 4
Exón 5
Exón 6
Exón 7
Exón 8
Exón 9
Exón 10
Exón 11
Exón 12
Exón 13
Exón 14
Exón 15
Exón 16
Exón 17
Exón 18
Exón 19
Exón 20
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Expresión del exón (% de control sano)
Control Sano
Paciente 3
Paciente 4

Fig. 4A

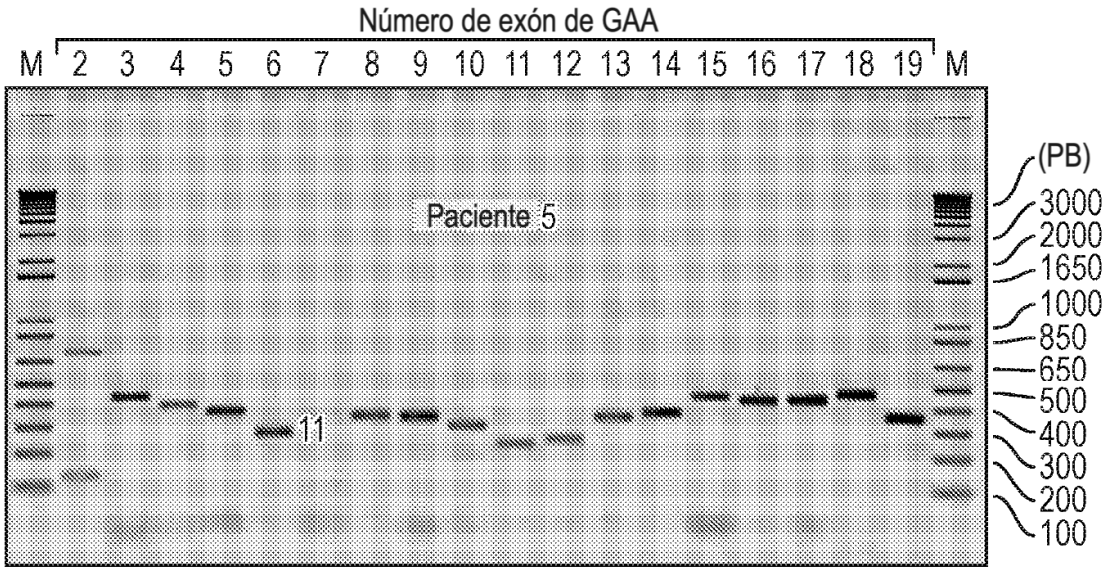

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 5
11
(PB)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 4B

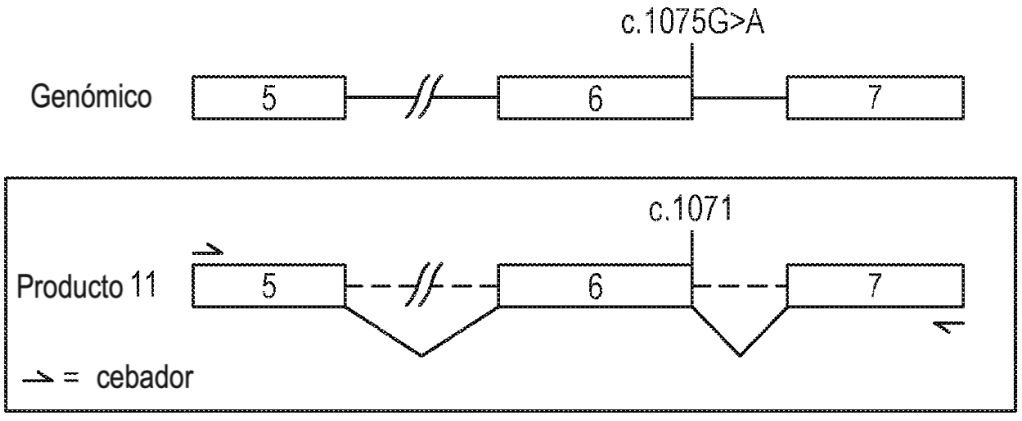

c.1075G>A
Genómico
5
6
7
c.1071
Producto 11
5
6
7
= cebador

Fig. 4C

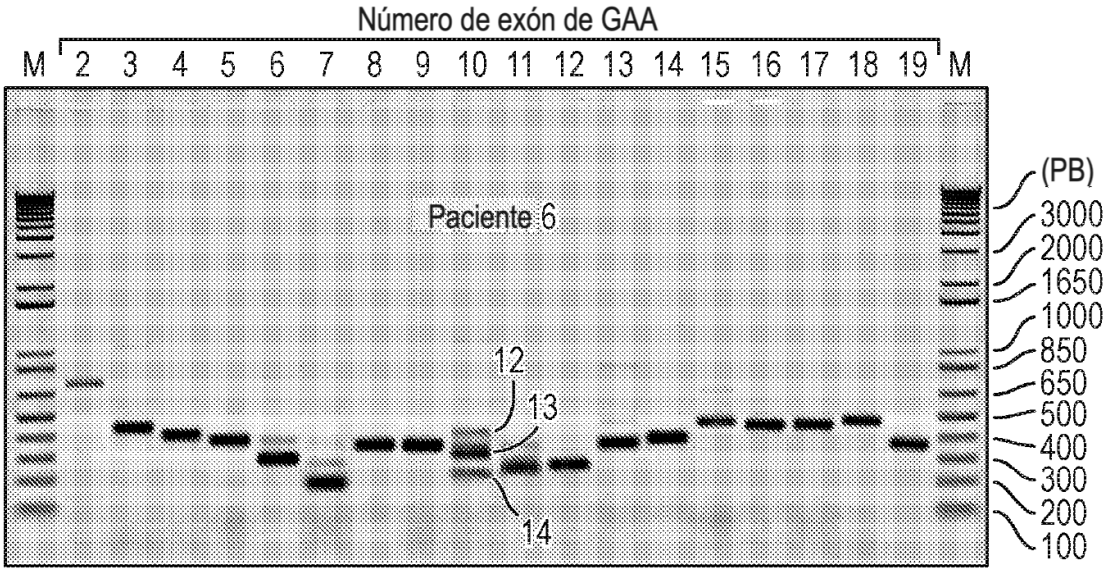

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 6
12
13
14
(PB)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 4D

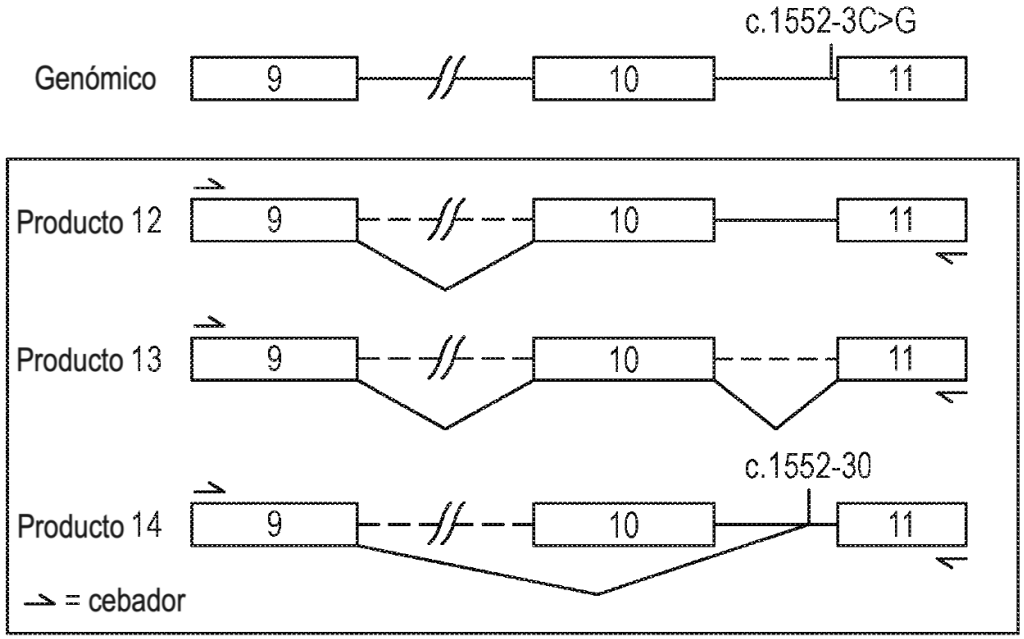

c.1552-3C>G
Genómico
9
10
11
Producto 12
Producto 13
Producto 14
c.1552-30
= cebador

Fig. 4E

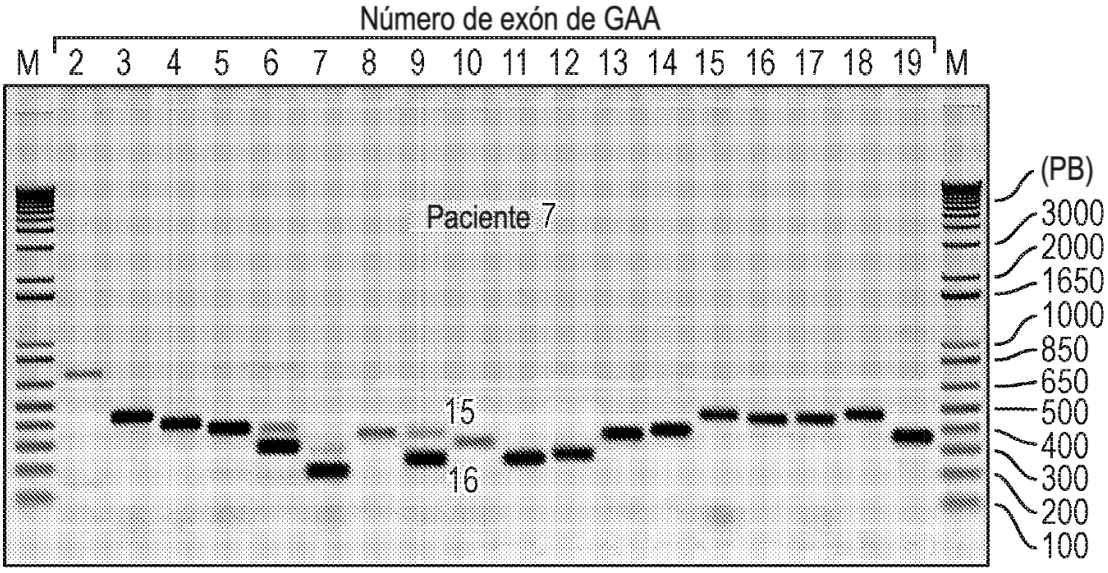

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 7
15
16
(PB)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 4F

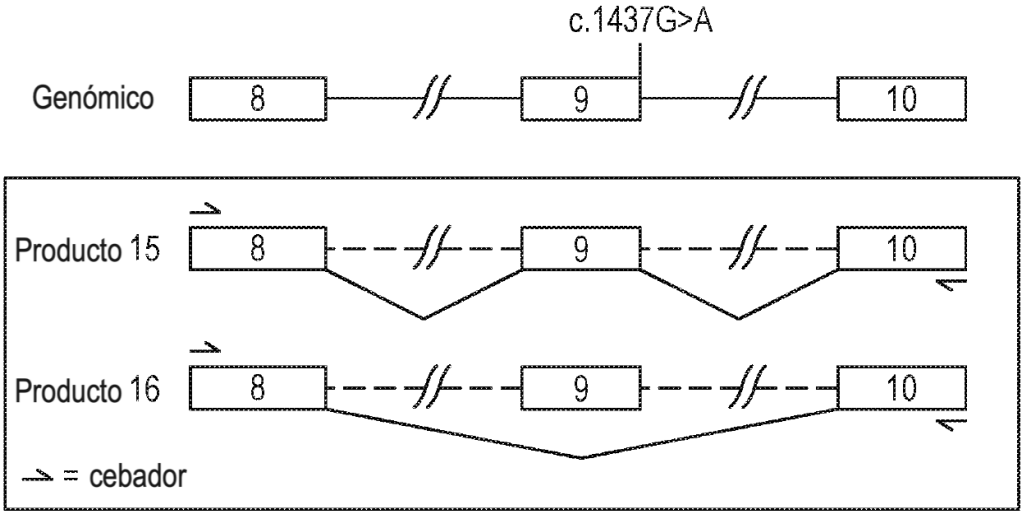

c.1437G>A
Genómico
8
9
10
Producto 15
8
9
10
Producto 16
8
9
10
= cebador

Fig. 4G

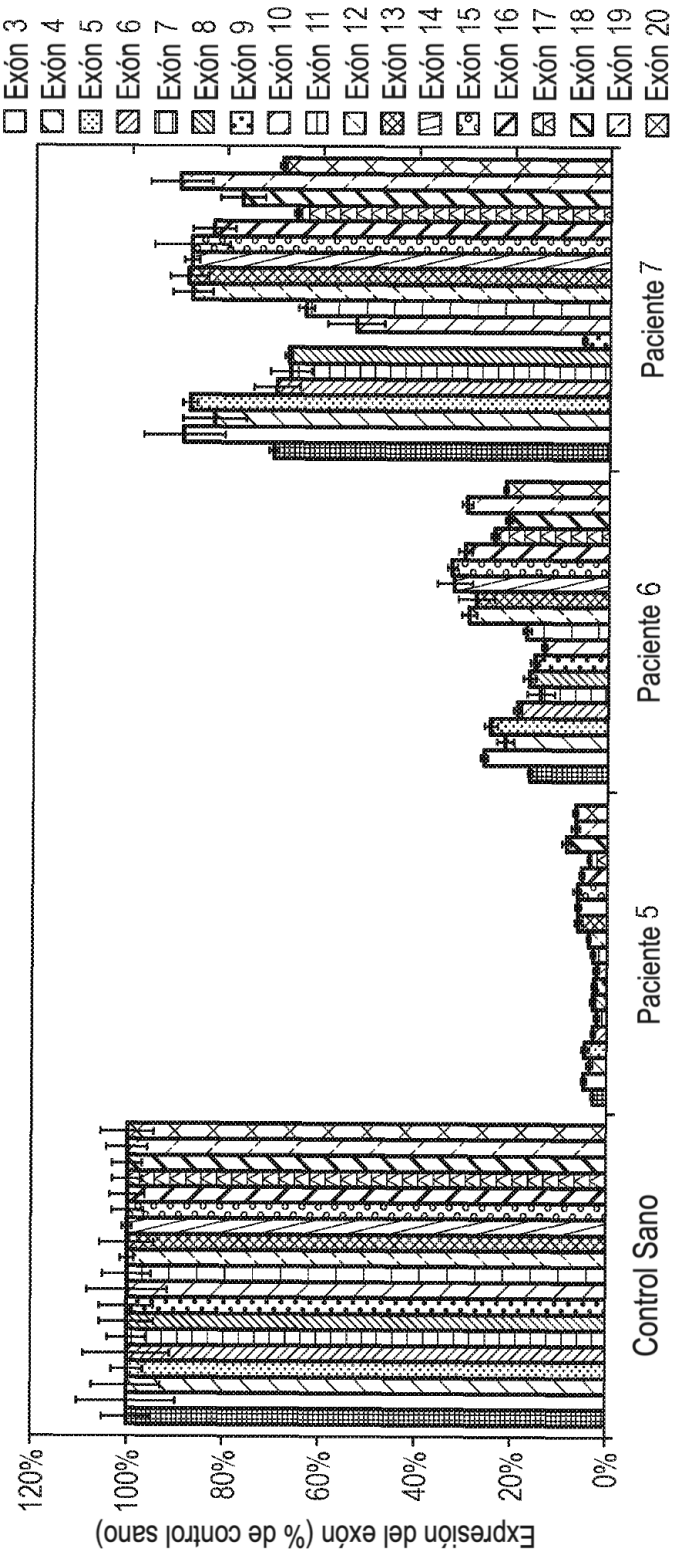

Exón 2
Exón 3
Exón 4
Exón 5
Exón 6
Exón 7
Exón 8
Exón 9
Exón 10
Exón 11
Exón 12
Exón 13
Exón 14
Exón 15
Exón 16
Exón 17
Exón 18
Exón 19
Exón 20
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Expresión del exón (% de control sano)
Control Sano
Paciente 5
Paciente 6
Paciente 7

Fig. 5A

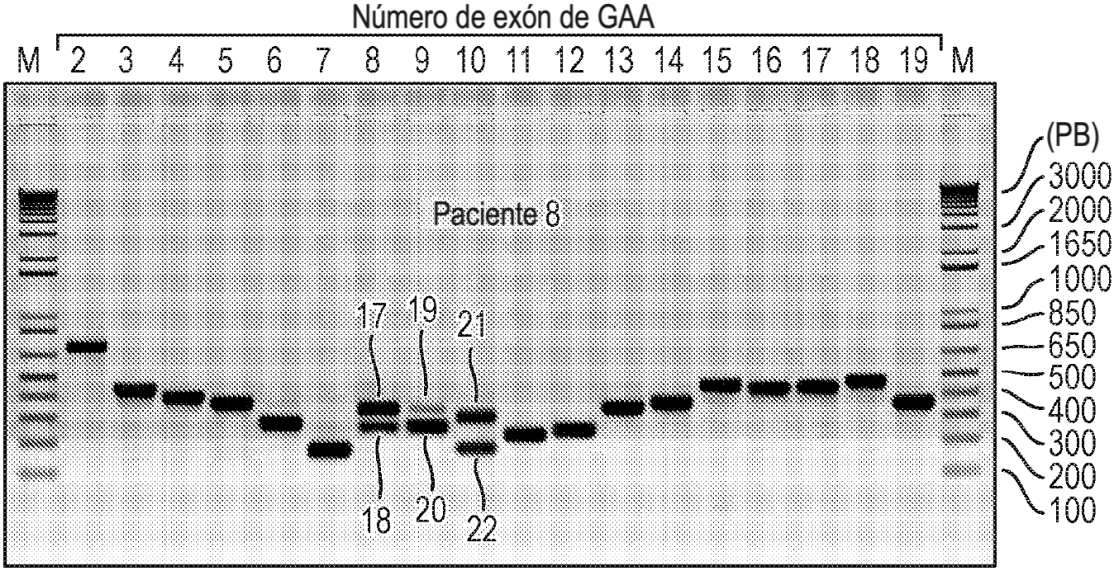

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 8
17 19 21
18 20 22
(PB)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 5B

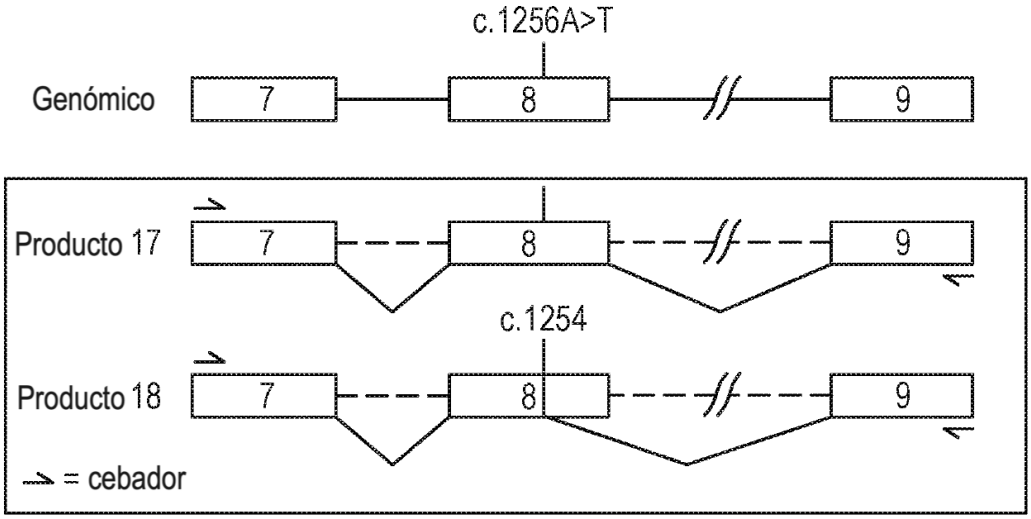

c.1256A>T
Genómico
7
8
9
Producto 17
7
8
9
c.1254
Producto 18
7
8
9
= cebador

Fig. 5C

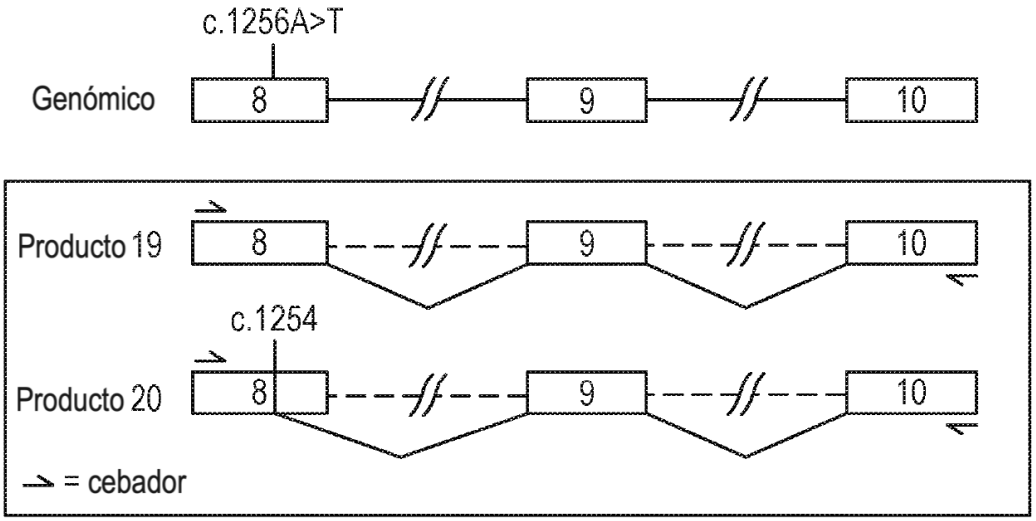

c.1256A>T
Genómico
8
9
10
Producto 19
8
9
10
c.1254
Producto 20
8
9
10
= cebador

Fig. 5D

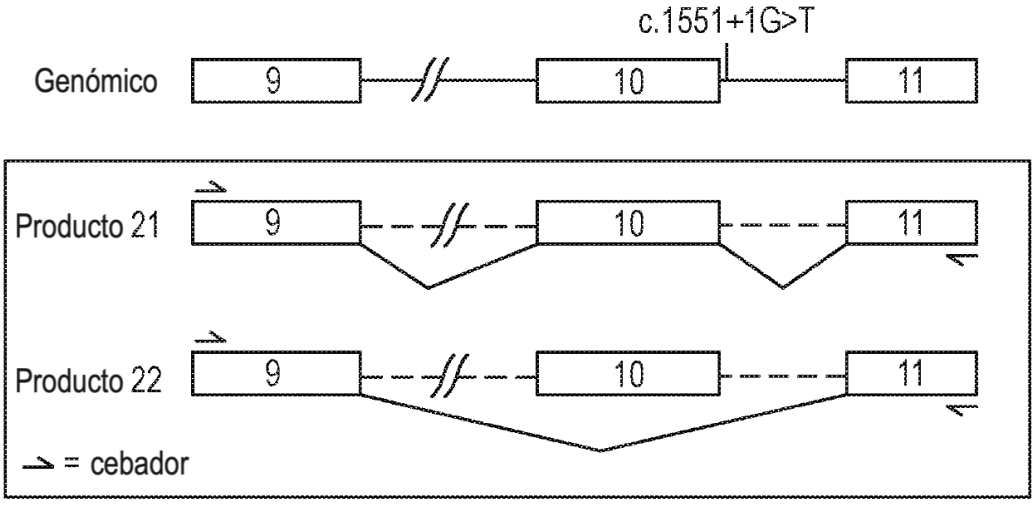

c.1551+1G>T
Genómico
9
10
11
Producto 21
9
10
11
Producto 22
9
10
11
= cebador

Fig. 5E

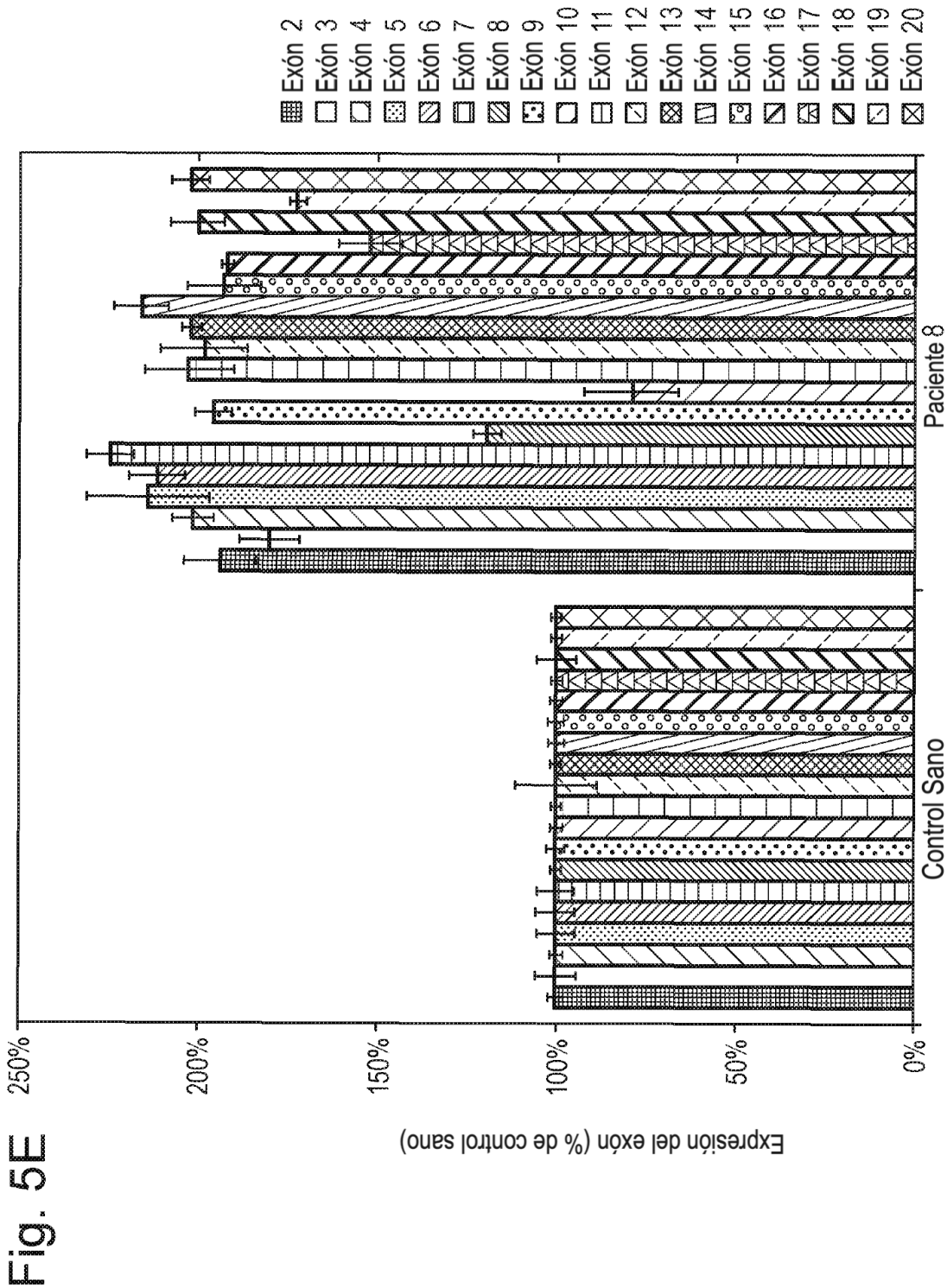

Exón 2
Exón 3
Exón 4
Exón 5
Exón 6
Exón 7
Exón 8
Exón 9
Exón 10
Exón 11
Exón 12
Exón 13
Exón 14
Exón 15
Exón 16
Exón 17
Exón 18
Exón 19
Exón 20
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Expresión del exón (% de control sano)
Control Sano
Paciente 8

Fig. 6

	Mutación alelo 1	Mutación alelo 2	Actividad de GAA en fibroblastos primarios sobre el sustrato 4-MU (nmol de 4-MU/h/mg de proteína)	Actividad de GAA en fibroblastos primarios sobre el sustrato de glucógeno (nmol de 4-MU/h/mg de proteína)	Edad cuando se diagnóstico	Inicio infantil/juvenil/adulto
Control	-	-	122.4	1998.2	-	ninguno
Paciente 1	c.-32-13T>G	c.1636+5G>T	14.1	190.6	59 años	adulto
Paciente 2	c.525delT	c.525delT	1.3	0.0	0.5 meses	infantil
Paciente 3	c.1548G>A	c.2481+102_246+31del	0.1	0.0	3.5 meses	infantil
Paciente 4	c.-32-3C>G	c.1551+1G>A	6.9	42.8	8.5 años	juvenil
Paciente 5	c.1075G>A	c.1075G>A	0.6	0.0	8.5 meses	infantil
Paciente 6	c.1552-3C>G	c.1552-3C>G	12.6	138.8	16 años	adulto
Paciente 7	c.1437G>A	c.1437G>A	3.0	0.0	37 años	adulto
Paciente 8	c.1256A>T	c.1551+1G>T	5.4	10.5	1.3 años	juvenil

Fig. 7

paciente	Mutación (nomenclatura del ADN: HGV)	Ubicación	cambio de codón	ref en el cambio de paciente/codón	efecto en el procesamiento del ARN	nomenclatura del ARN HGV	marco de lectura	nomenclatura de proteína HGV	Referencia sobre el Empalme
1	c.-32-13T>G (IVS1)	intrón 1		Hüe et al., Hum Mol Gen. 1994	empalme de tipo silvestre defectuoso		en marco		Boerkoel et al., Am. J. Hum. Gen. 1995
				Hüe et al., Hum Mol Gen. 1994	exón 2 de omisión perfecta	r.-32_546del	fuera del marco	p.?	Boerkoel et al., Am. J. Hum. Gen. 1995
				Hüe et al., Hum Mol Gen. 1994	exón 2 de omisión perfecta	r.-32_486del	fuera del marco	p.?	Boerkoel et al., Am. J. Hum. Gen. 1995
1	c.1636+5G>T	intrón 11		Kroos et al., JIMD 2006	inclusión de intrón 11	r.1636_1637ins1636+1_1636+957+r.1638+5g>t	fuera del marco	p.G546_V547ins145X145	Kroos et al., JIMD 2006
2	c.526delT	exón 2	p.E176fs*45	Hermans et al., Hum Mol Gen. 1994	codón de parada prematura	r.526delt	fuera del marco	p.E176fs*45	Hermans et al., Hum Mol Gen. 1994
3	c.1548G>A	exón 10	p.W516*	Hermans et al., Hum Mut 2004	codón de parada prematura	r.1548g>a	nuevo codón de parada	p.W516*	Hermans et al., Hum Mut 2004
3	c.2461 -102_2646+31del (del ex18)	intrón 17-intrón 18	p.G829_N882del	Hüe et al., Hum Mol Gen. 1994	eliminación del exón 18 completo	r.2461_2646del	en marco	p.G829_N882del	Hüe et al., Hum Mol Gen 1994
4	c.-32-3C>G	intrón 1		este estudio	empalme de tipo silvestre defectuoso		en marco		este estudio
				este estudio	exón 2 de omisión parcial	r.-32_486del	fuera del marco	p.?	este estudio
				este estudio	exón 2 de omisión perfecta	r.-32_546del	fuera del marco	p.?	este estudio
4	1551+1G>A	intrón 10		Orlikowski et al., Neuromus. Dis. 2011	exón 10 de omisión perfecta	r.1438_1551del	en marco	p.V480_D517del	este estudio
5	c.1075G>A	exón 6	p.G359R	Schoser et al., Neuromus. Dis. 2007	eliminación de 4 nt del exón 6	r.1072_1075del	fuera del marco	p.D375fs*33	este estudio
6	c.1552-3C>G	intrón 10		Kroos et al., JIMD 2006	empalme de tipo silvestre defectuoso		en marco		Kroos et al., JIMD 2006
					inclusión del intrón 10 completo	r.1551_1552ins1551+1_1552-1nt1552-3c>g	fuera del marco	p.D517fs*6	este estudio
				Kroos et al., JIMD 2006	intrón 10 de inclusión parcial	r.1551_1552ins1552-39_1551+100-nt1552-3c>g	en marco	p.D517_V518ins10	Kroos et al., JIMD 2006
7	c.1437G>A	exón 9	silencioso	Kroos et al., Hum Mut 2008	empalme de tipo silvestre defectuoso	r.1437g>a	en marco		Kroos et al., Hum Mut 2008; este estudio
					exón 9 de omisión perfecta	r.1327_1437del	en marco	p.D443_K479del	este estudio
8	c.1256A>T	exón 8	p.D419V	Kroos et al., Hum Mut 2012	empalme de tipo silvestre defectuoso	r.1256a>t	en marco	p.D419V	este estudio
				este estudio	omisión parcial del exón 8	r.1255_1326del	en marco	p.K418_D443del	este estudio
8	c.1551+1G>T	intrón 10		Kroos et al., Hum Mut 2012	empalme de tipo silvestre defectuoso		en marco		este estudio
				este estudio	omisión perfecta del exón 10	r.1438_1551del	en marco	p.V480_D517del	este estudio

Fig. 8A

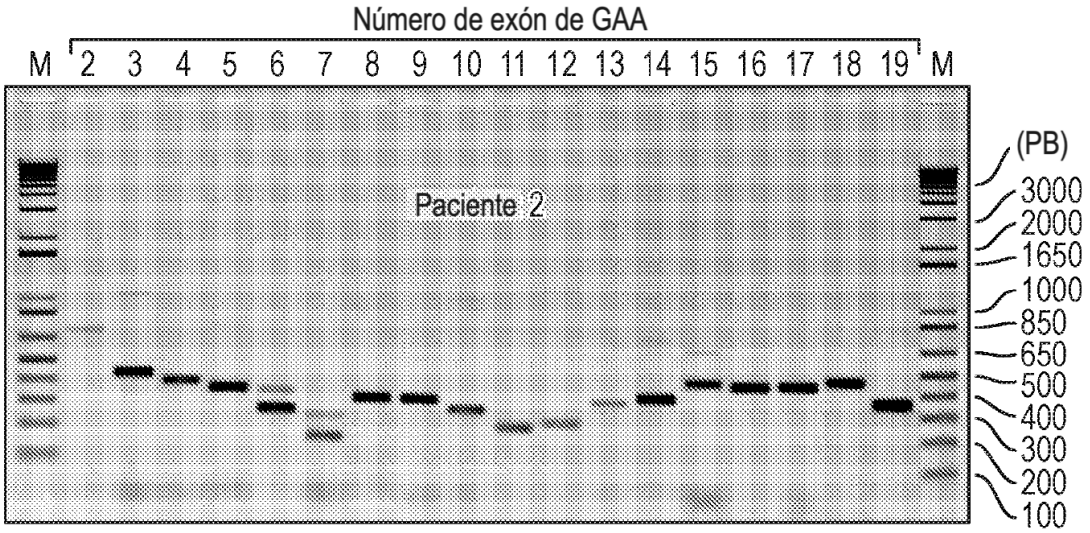

Número de exón de GAA
M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
Paciente 2
(PB)
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 8B

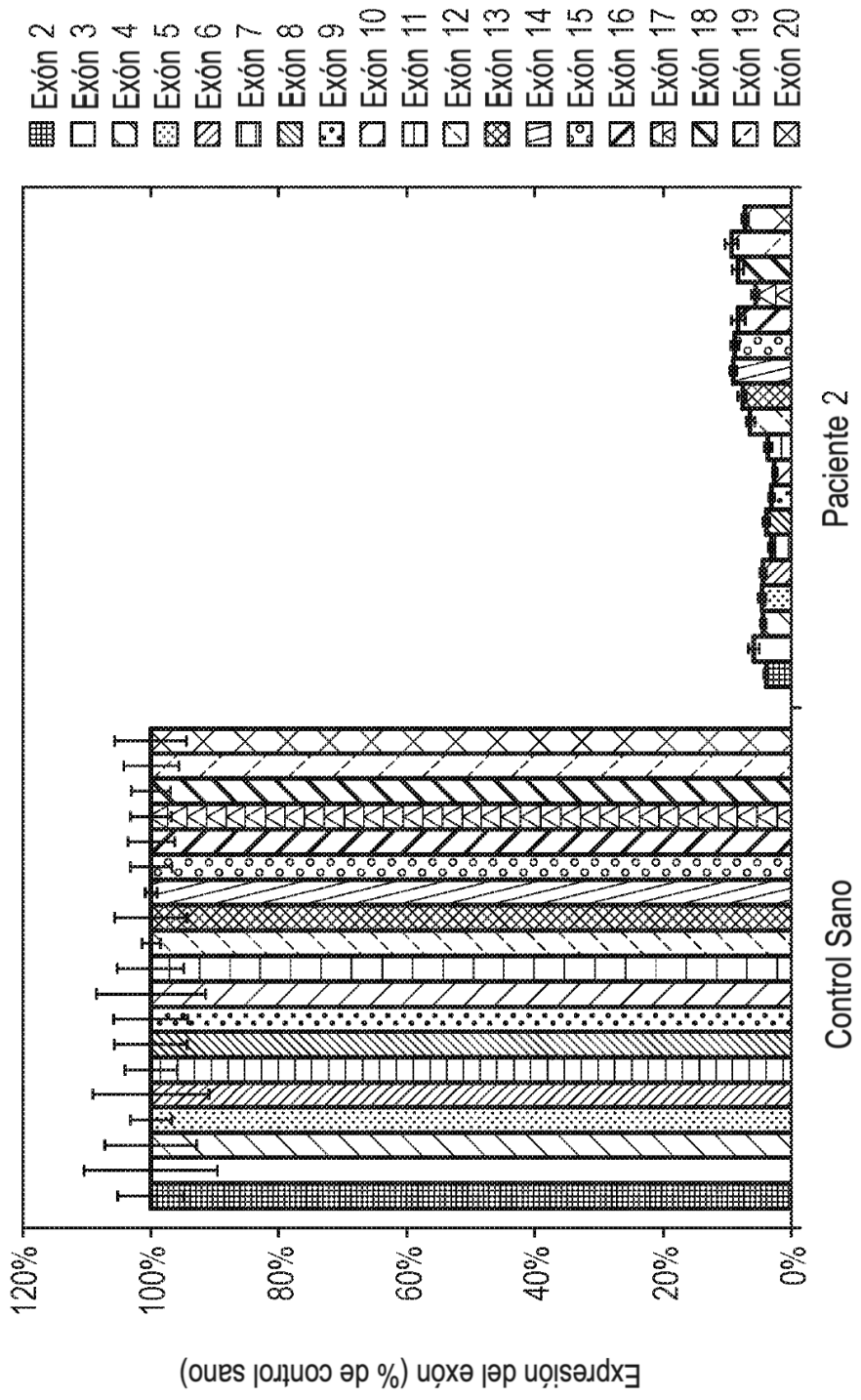

Exón 2
Exón 3
Exón 4
Exón 5
Exón 6
Exón 7
Exón 8
Exón 9
Exón 10
Exón 11
Exón 12
Exón 13
Exón 14
Exón 15
Exón 16
Exón 17
Exón 18
Exón 19
Exón 20
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Expresión del exón (% de control sano)
Control Sano
Paciente 2

Fig. 9

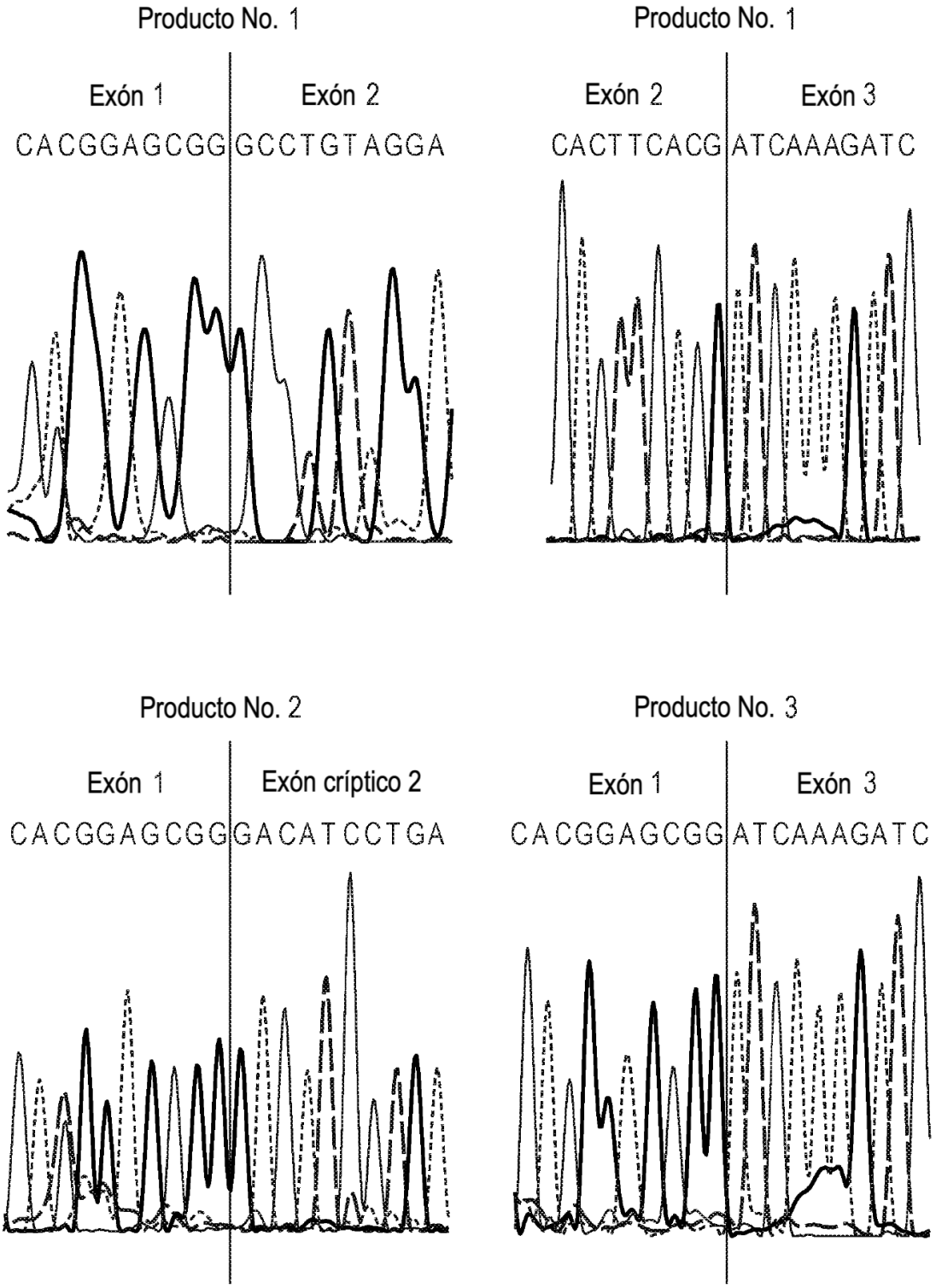

Producto No. 1
Exón 1
Exón 2
CACGGAGCGGGCCTGTAGGA
Producto No. 1
Exón 2
Exón 3
CACTTCACGATCAAAGATC
Producto No. 2
Exón 1
Exón críptico 2
CACGGAGCGGGACATCCTGA
Producto No. 3
Exón 1
Exón 3
CACGGAGCGGATCAAAGATC

Fig. 10A

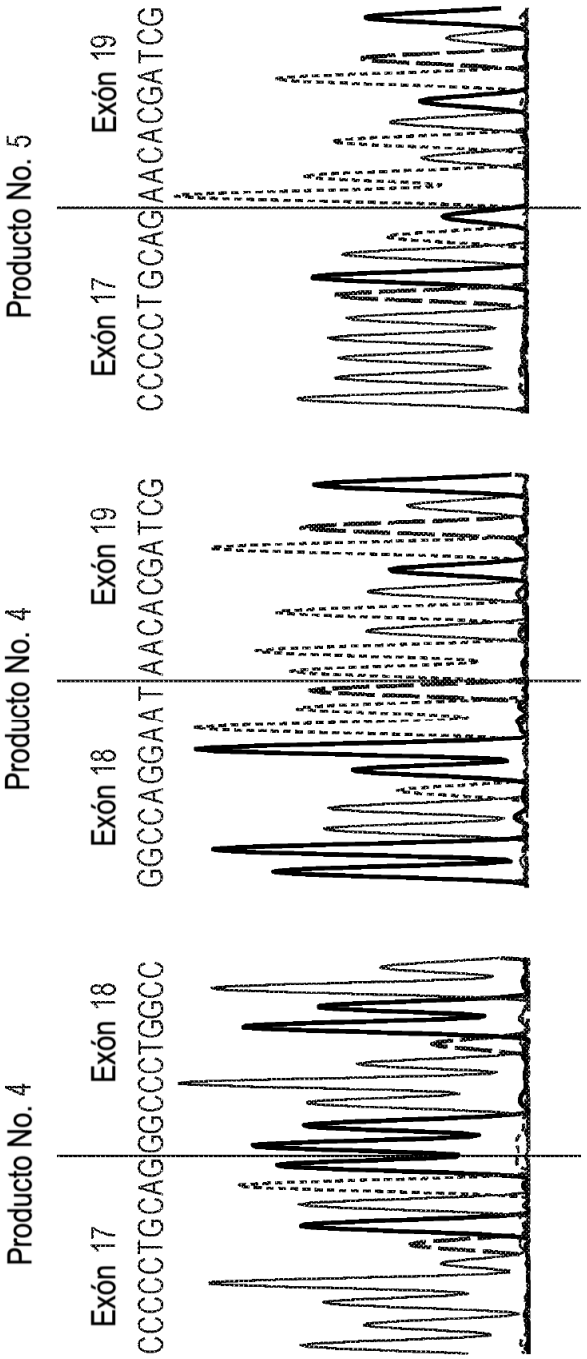

Producto No. 4
Exón 17
CCCCCTGCAG
Exón 18
GGCCCCTGCC
Producto No. 4
Exón 18
GGCCAGGAAT
Exón 19
AACACGATCG
Producto No. 5
Exón 17
CCCCCTGCAG
Exón 19
AACACGATCG

Fig. 10B

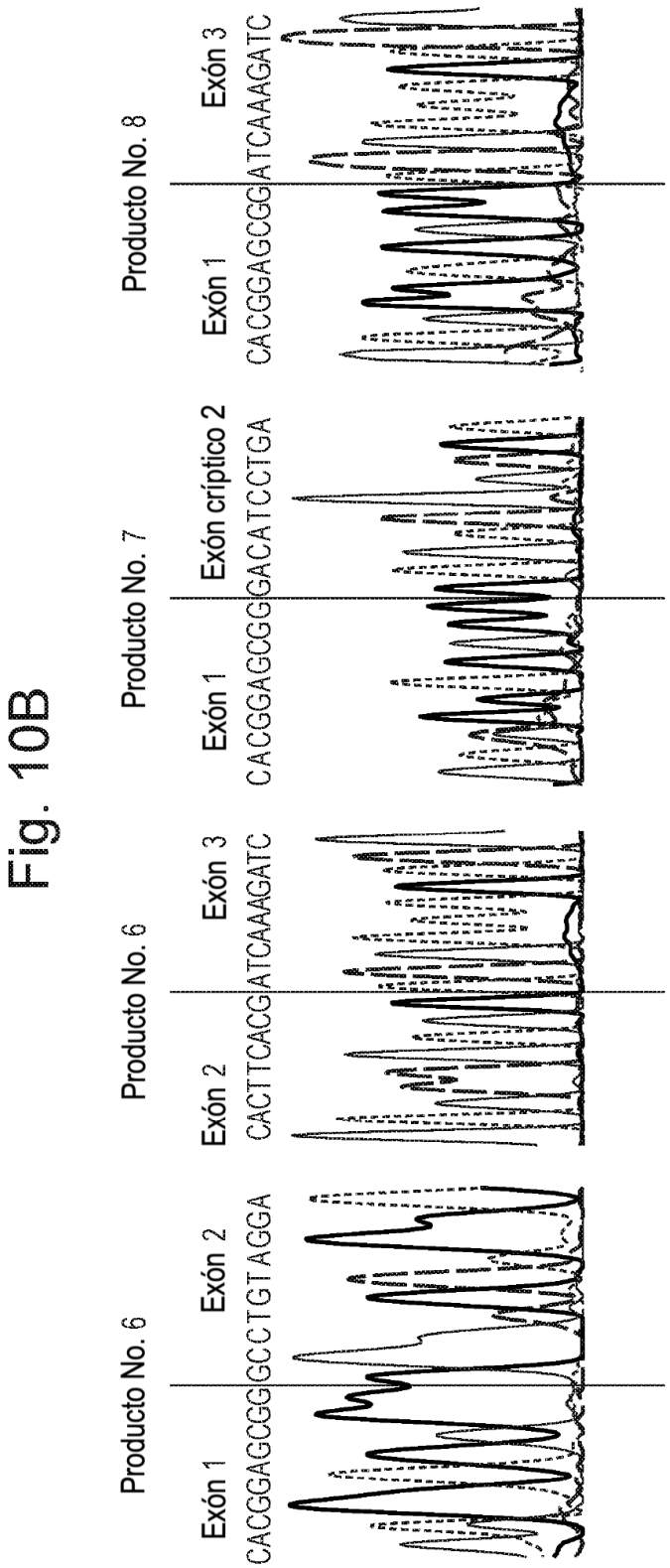

Producto No. 6
Exón 1
CACGGAGCGG
Exón 2
GCCTGTAGGA
Producto No. 6
Exón 2
CACTTCACGG
Exón 3
ATCAAAGATC
Producto No. 7
Exón 1
CACGGAGCGG
Exón críptico 2
GACATCCTGA
Producto No. 8
Exón 1
CACGGAGCGG
Exón 3
ATCAAAGATC

Fig. 10C

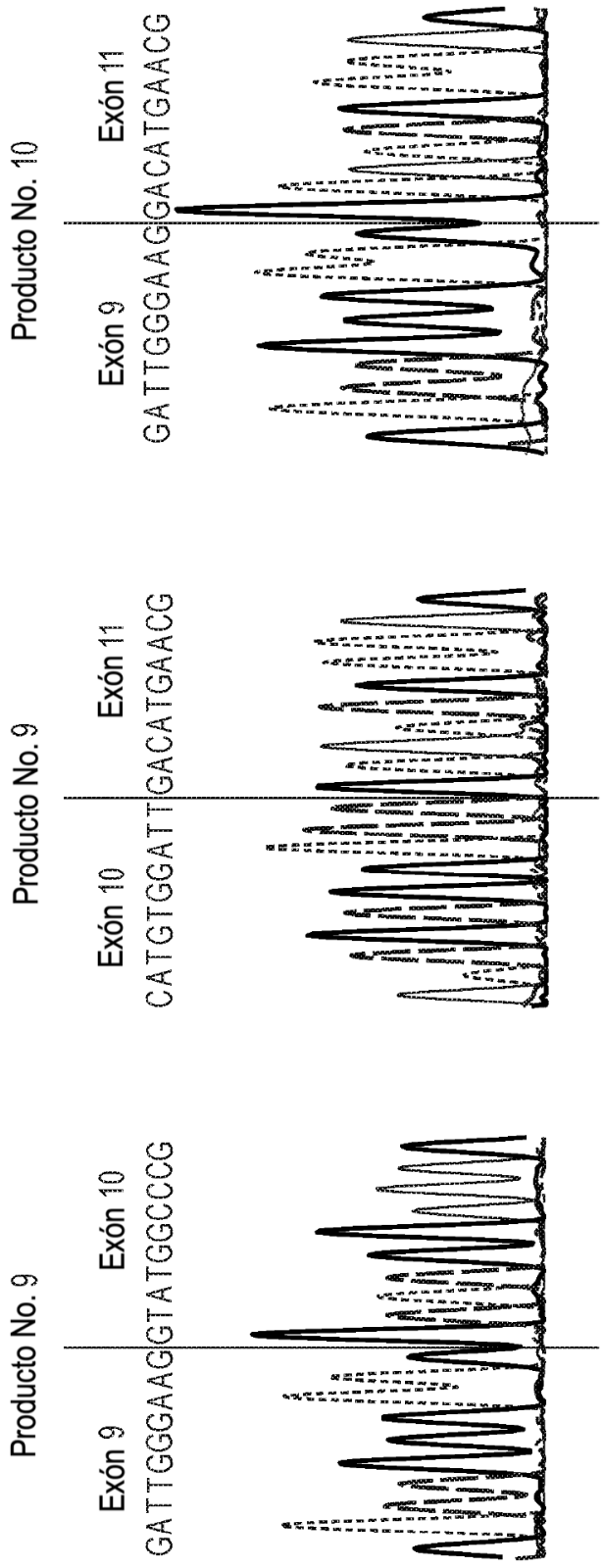

Producto No. 9
Exón 9
Exón 10
GATTGGGAAGGTATGGCCCG
Producto No. 9
Exón 10
Exón 11
CATGTGGATTGACATGAACG
Producto No. 10
Exón 9
Exón 11
GATTGGGAAGGACATGAACG

Fig. 11A

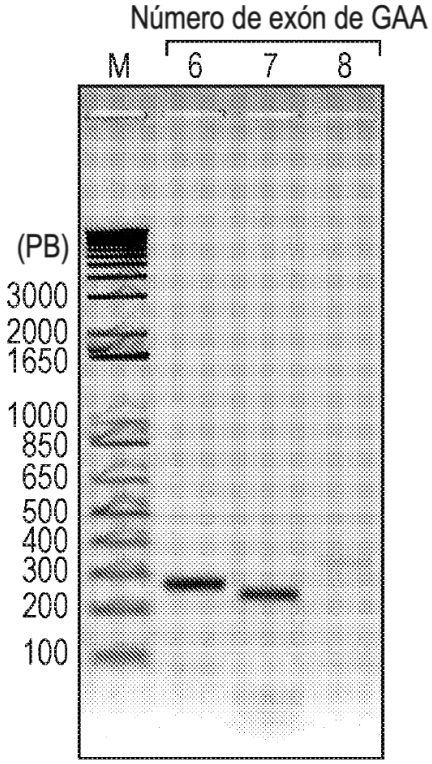


Fig. 11B

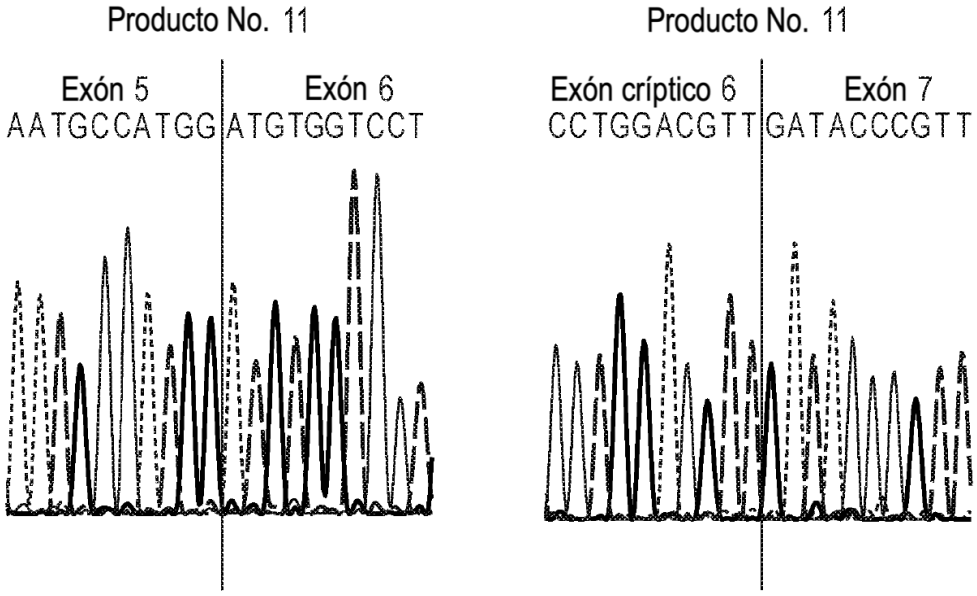


Fig. 11C

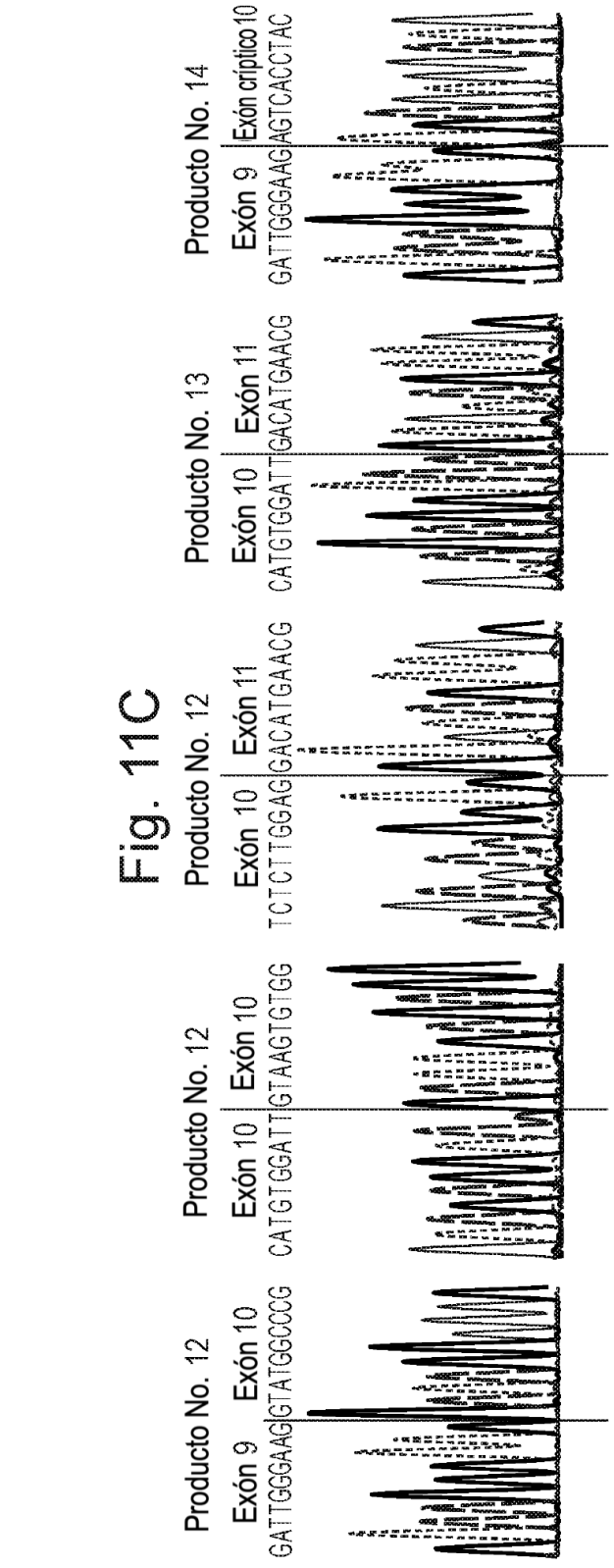


Fig. 11D

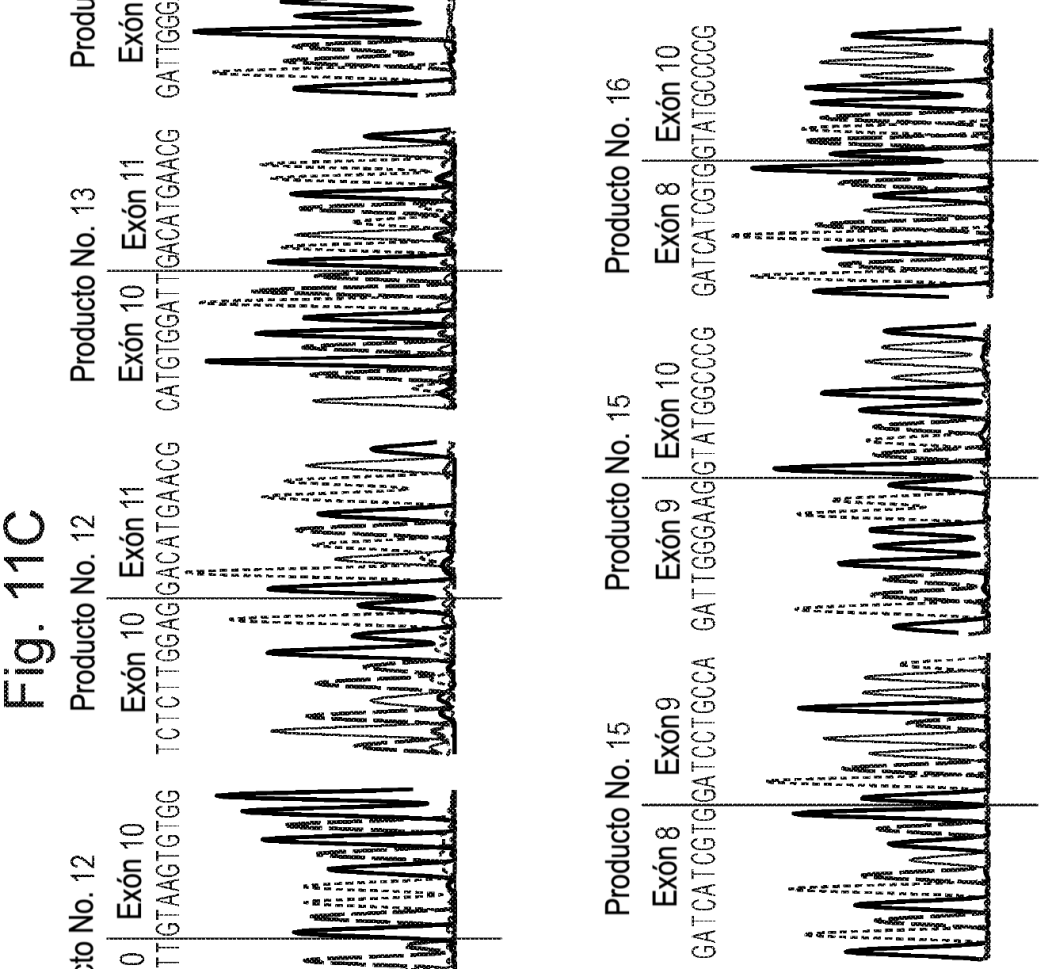


Fig. 12

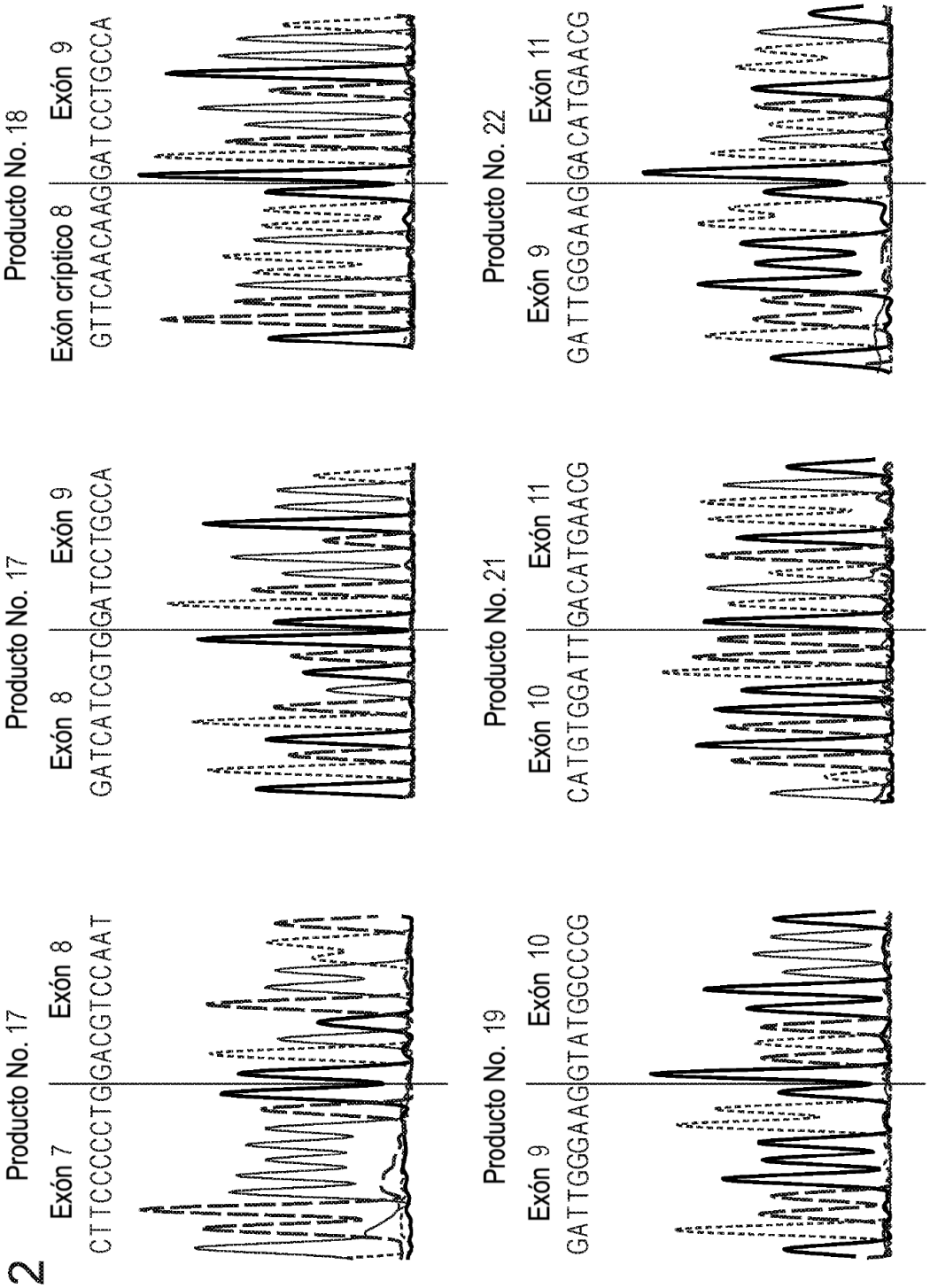

Producto No. 17
Exón 7
Exón 8
CTTCCCCCTGGACGTCCAAT
Producto No. 17
Exón 8
Exón 9
GATCATCGTGGATCCTGCCA
Producto No. 18
Exón críptico 8
Exón 9
GTTCAACAAGGATCCTGCCA
Producto No. 19
Exón 9
Exón 10
GATTGGGAAGGTATGGCCCG
Producto No. 21
Exón 10
Exón 11
CATGTGGATTGACATGAACG
Producto No. 22
Exón 9
Exón 11
GATTGGGAAGGACATGAACG

Fig. 13

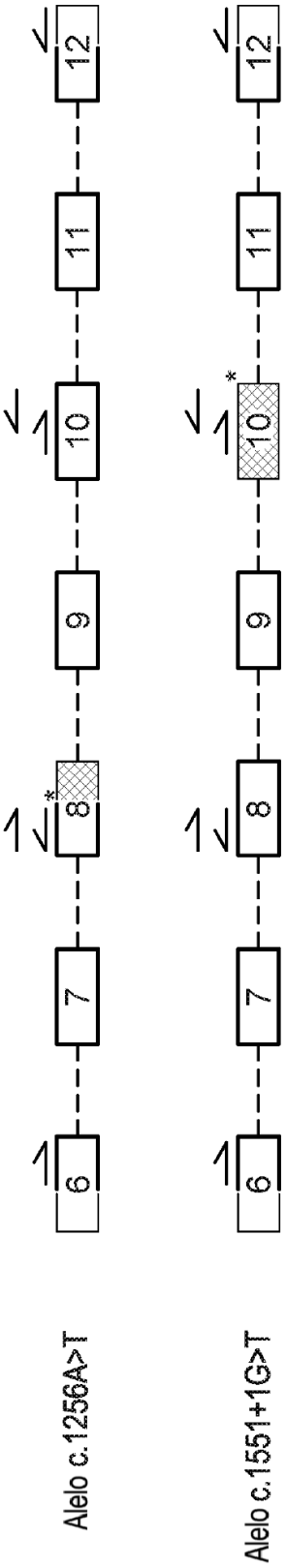


Fig. 14A

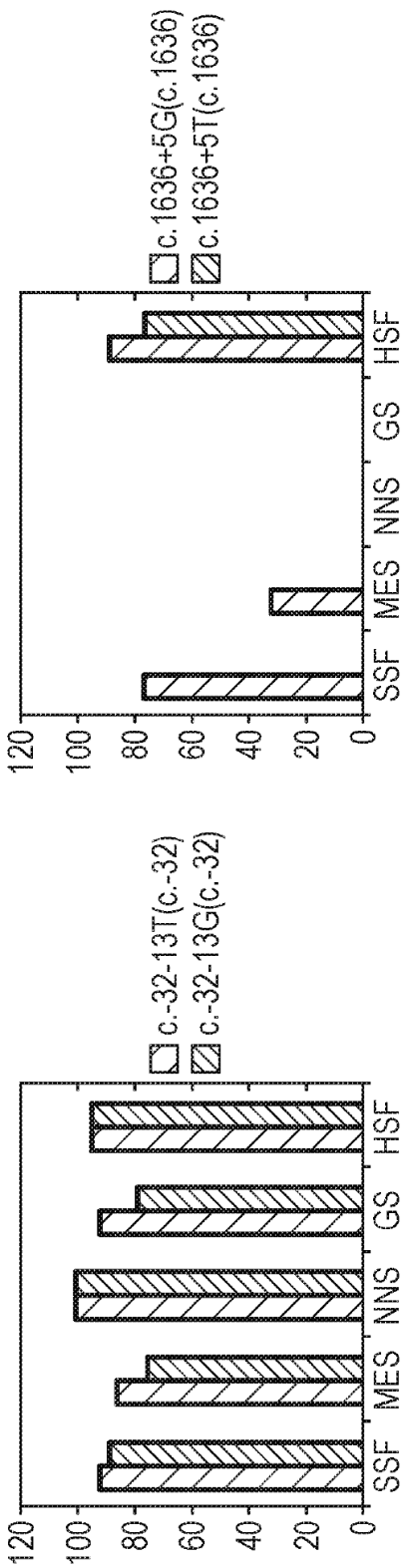


Fig. 14B

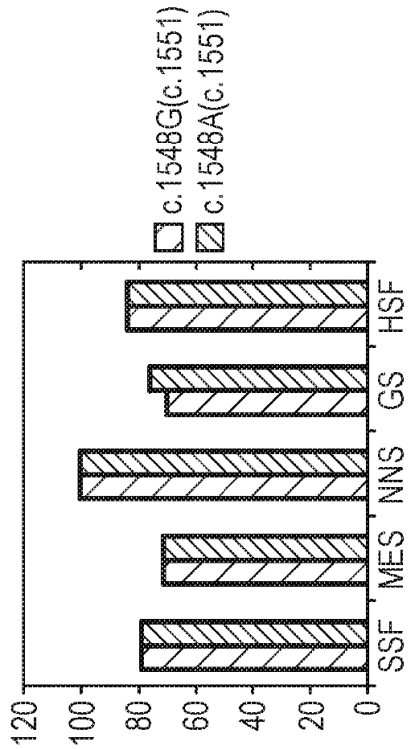


Fig. 14C

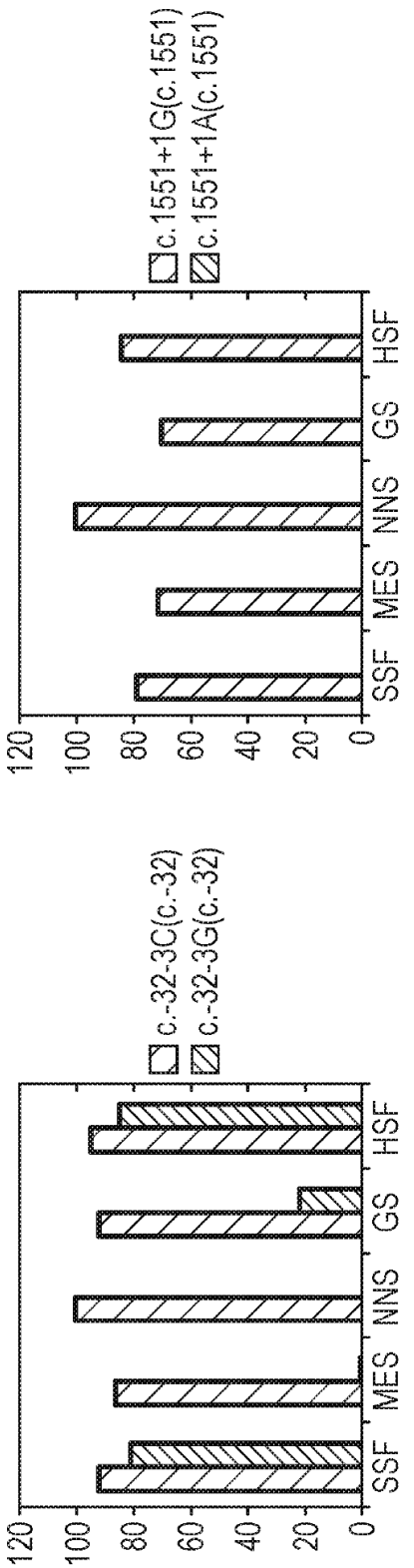


Fig. 14D

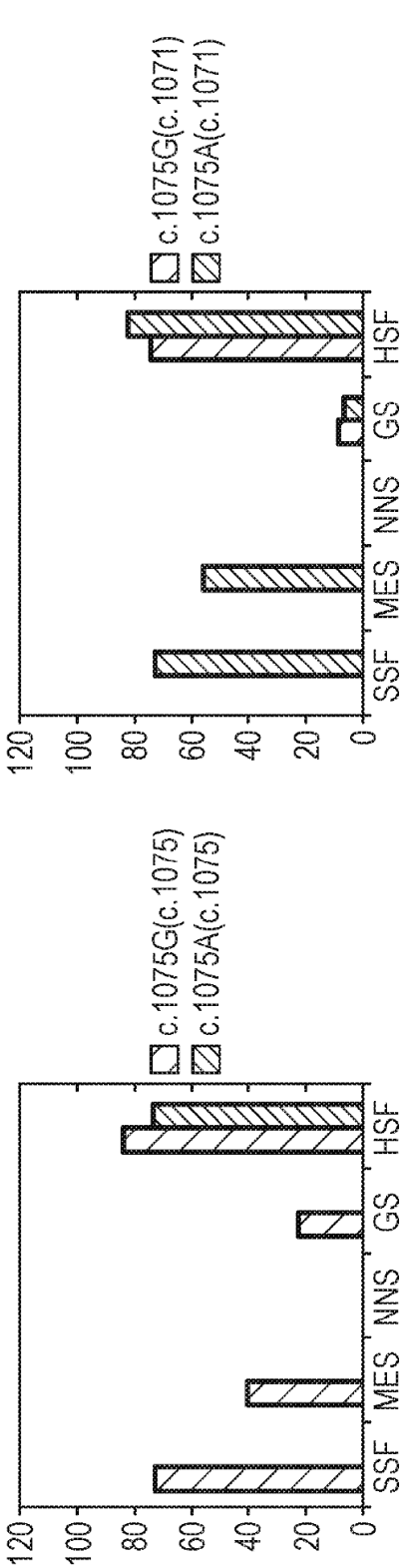


Fig. 14E

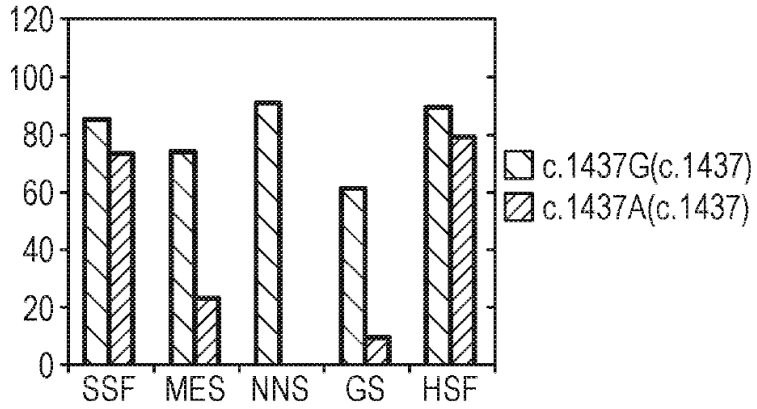

120
100
80
60
40
20
0
SSF
MES
NNS
GS
HSF
c.1437G(c.1437)
c.1437A(c.1437)

Fig. 14F

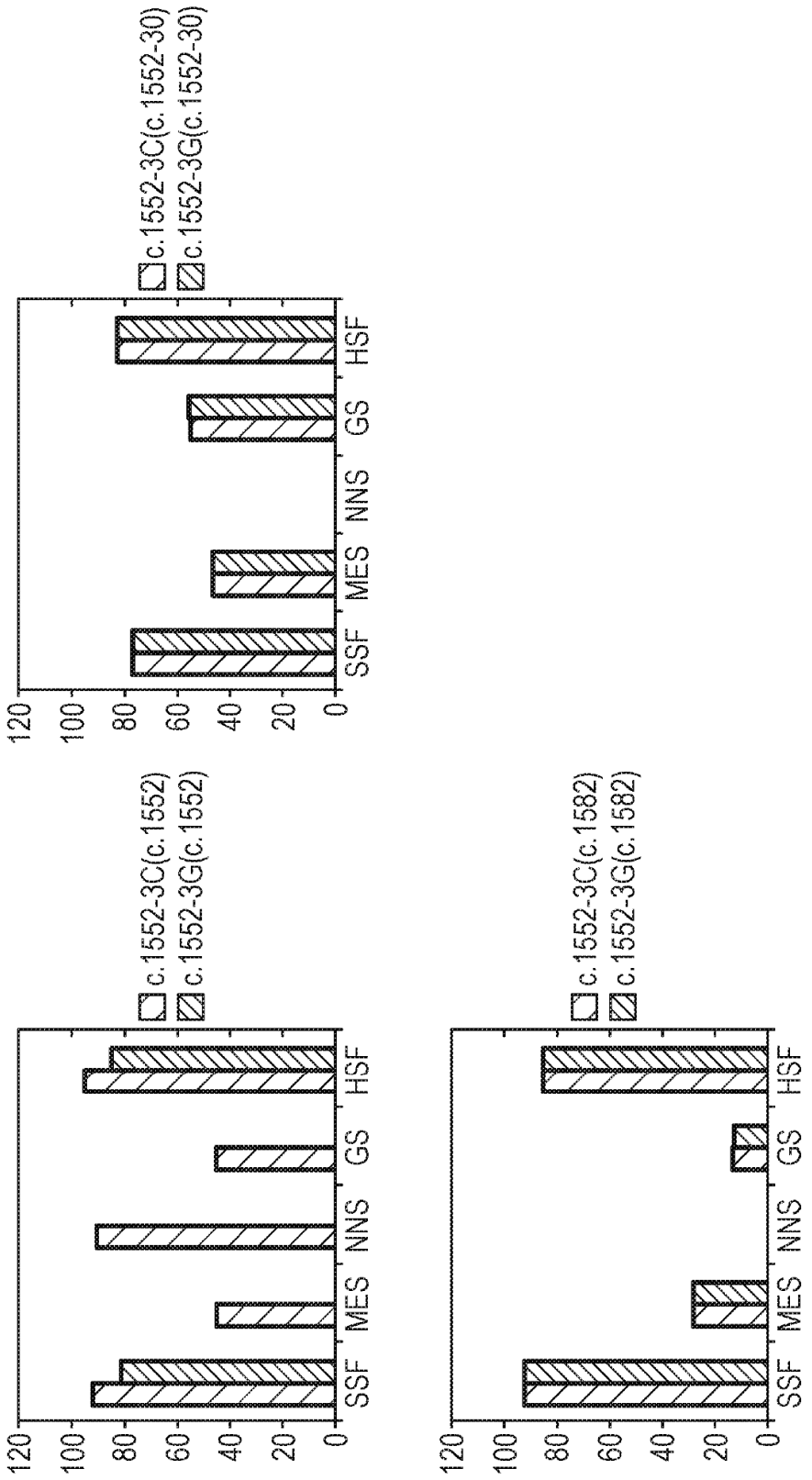

c.1552-3C(c.1552-30)
c.1552-3G(c.1552-30)
c.1552-3C(c.1552)
c.1552-3G(c.1552)
c.1552-3C(c.1582)
c.1552-3G(c.1582)
120
100
80
60
40
20
0
SSF
MES
NNS
GS
HSF

Fig. 14G

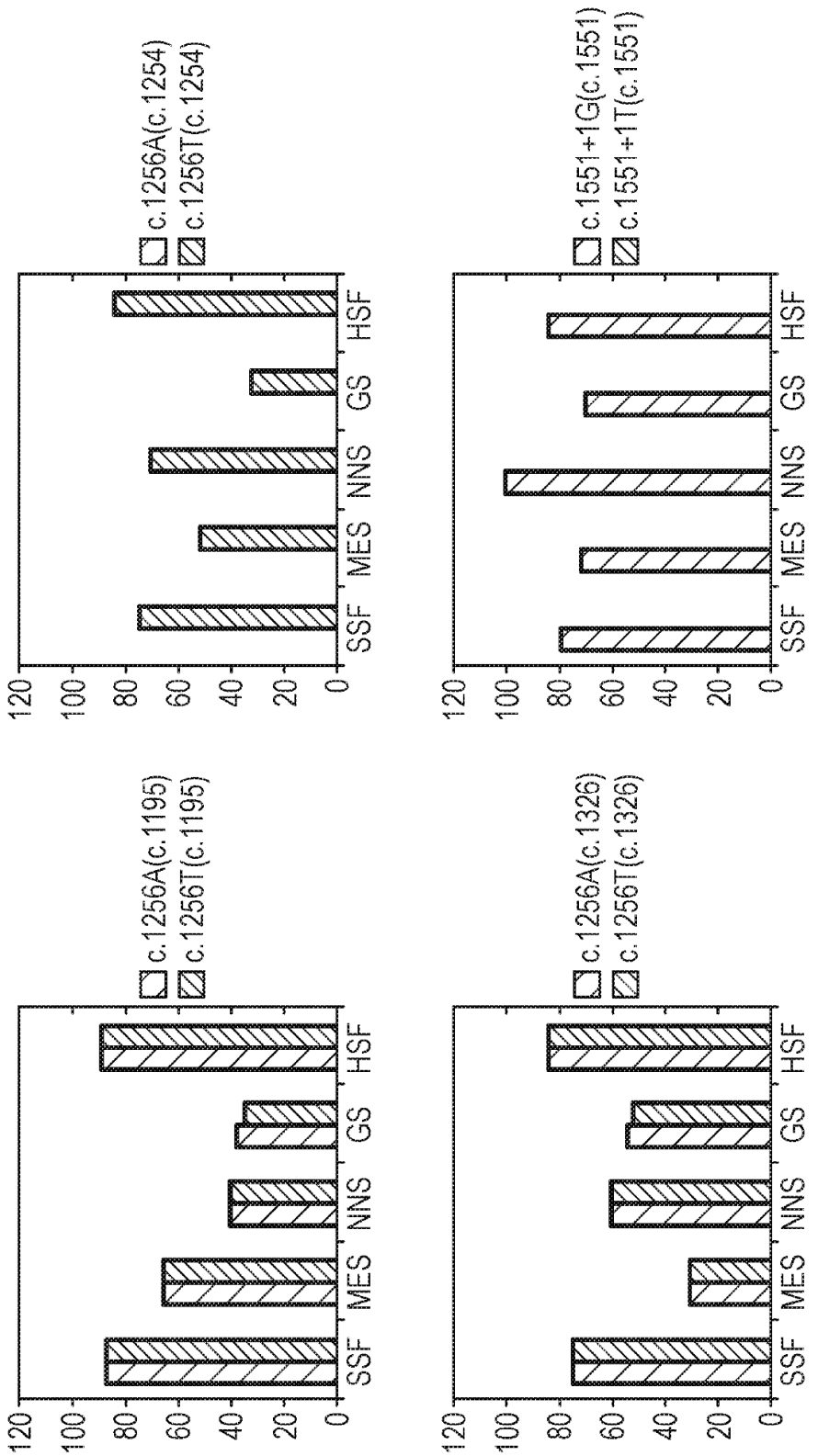

c.1256A(c.1254)
c.1256T(c.1254)
c.1551+1G(c.1551)
c.1551+1T(c.1551)
c.1256A(c.1195)
c.1256T(c.1195)
c.1256A(c.1326)
c.1256T(c.1326)
120
100
80
60
40
20
0
SSF
MES
NNS
GS
HSF

Fig. 15

Exón probado:	Directo:	Inverso:	Producto de longitud completa:	Tamaño del exón:	Producto omitido:
Exón 2 de GAA	AAACTGAGGCACGGAGCG	GAAGGGCTCCTCGGAGAA	705	578	127
Exón 3 de GAA	AGCTCCTCTGAAATGGGCTACA	GCAAGGTCCCGGTTCCACA	428	146	282
Exón 4 de GAA	GCTAACAGGCGCTACGAGGT	TGCTGTTTAGCAGGAACACCC	388	166	222
Exón 5 de GAA	CTGTTCTTTGCGGACCAGTTC	CCACAACGTCCAGGTACTGCT	361	97	265
Exón 6 de GAA	GGTCTCACCCTTTCTACCTGG	GTGATAGCGGTGGAGGAGTAG	274	120	154
Exón 7 de GAA	CAGCAGTACCTGGACGTTGTG	AGTCCATGTAGTCCAGGTCGTT	175	119	56
Exón 8 de GAA	CGTTCATGCCGCCATACT	GGTCTCGTTGGTGATGAAAAC	335	132	203
Exón 9 de GAA	GACGTCCAGTGGAACGACCT	ACCTGGTCATGGAACTCAGC	335	111	224
Exón 10 de GAA	GATCCTGCCATCAGCAGCT	TGGGTTCTCCAGCTCATTGT	297	114	183
Exón 11 de GAA	AGGACATGGTGGCTGAGTTC	CGTAGAGGTTGTGCAGGTTGTA	228	85	143
Exón 12 de GAA	AACGAGCCTTCCAACTTCATC	GAGCGGGAGATCACAAATGG	245	118	127
Exón 13 de GAA	CACCAGTTTCTCTCCACACACTA	GTTCCGCATGAAGGGGTAGA	337	134	202
Exón 14 de GAA	ACACGCCCATTTGTGATCTC	GTGTAGAGGTGGGGGAGGAGT	356	152	204
Exón 15 de GAA	AAATCCTGCAGTTTAACCTGCTG	GCAGGTCGTACCATGTGCC	438	149	289
Exón 16 de GAA	GAGCCGTACAGCTTCAGCGA	ATGTACCCAGCCCGGAGGT	422	142	280
Exón 17 de GAA	CCTGGACTGTGGACCACCA	CAGGAAGATGACCTGTGTGTAGG	428	150	278
Exón 18 de GAA	GTGCCAGTAGAGGCCCTTG	GGCTGTAGGTGAAGTTGGAGAC	457	165	292
Exón 19 de GAA	TCACAACCACAGAGTCCCG	AGAAACTGCTCTCCCATCAACA	352	153	199

Fig. 16

	Directo	Inverso
B-Actina	AACCGCGAGAAGATGACCC	GCCAGAGGCGTACAGGGATAG
Exón 2 de GAA	AGCTCCTCTGAAATGGGCTACAC	GGTTCTCAGTCTCCATCATCACG
Exón 3 de GAA	ATCCAGCTAACAGGCGCTAC	GCTCCTCGGAGAACTCCAC
Exón 4 de GAA	CTGTTCTTTGCGGACCAGTT	CTGAGCATCAGGGGACTGAG
Exón 5 de GAA	CGAACCTCTACGGGTCTCAC	TGCTGTTTAGCAGGAACACC
Exón 6 de GAA	CTTAGCTGGAGGTCGACAGG	CACAACGTCCAGGTACTGCT
Exón 7 de GAA	CGTTCATGCCGCCATACT	GGTCATGTTCTCCACCACCT
Exón 8 de GAA	GACGTCCAGTGGAACGACCT	GAAGTCCCGGAAGCCATC
Exón 9 de GAA	ATCCTGCCATCAGCAGCTC	GGTCTCGTTGGTGATGAAAA
Exón 10 de GAA	CACTGCCTTCCCCGACTT	ACCTGGTCATGGAACTCAGC
Exón 11 de GAA	ACATGAACGAGCCTTCCAAC	ACGTAGGGTGGGTTCTCCAG
Exón 12 de GAA	CCTCCAGCCACCAGTTTCTCT	TGTGGGAGGCGATGGCTT
Exón 13 de GAA	GACACGCCCATTTGTGATCT	CCAGGAGCTCCACACGTC
Exón 14 de GAA	CTCAGAGGAGCTGTGTGTGC	CAGACTGAGCAGGCTGTTGT
Exón 15 de GAA	CAGCAGGCCATGAGGAAG	GGCCTGGTGGAACAGTGTG
Exón 16 de GAA	CCCAAGGACTCTAGCACCTG	CAAGGGGAAGTAGCCAGTCA
Exón 17 de GAA	GTGCCAGTAGAGGCCCTTG	GAGGTGGACGTTGATGGTGT
Exón 18 de GAA	GCCTCACAACCACAGAGTCC	TCTCTCCATCGTCCCAGAAC
Exón 19 de GAA	TGCAGAAGGTGACTGTCCTG	GGGCTGTAGGTGAAGTTGGA
Exón 20 de GAA	GGGCGGAGTGTGTTAGTCTC	CTCCAGGTGACACATGCAAC

Fig. 17

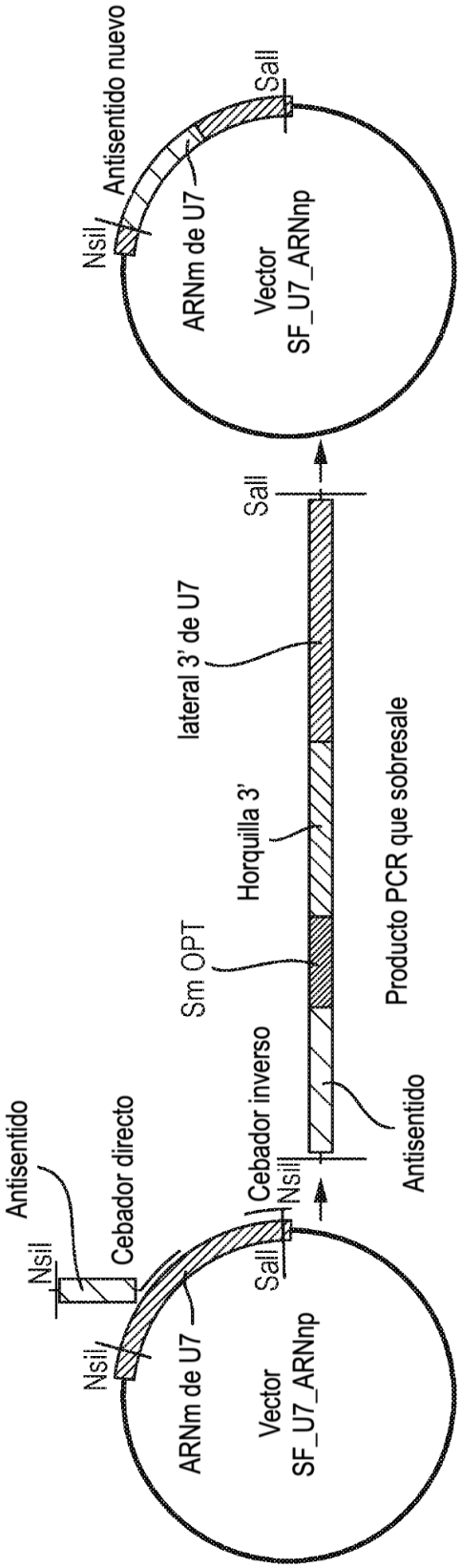
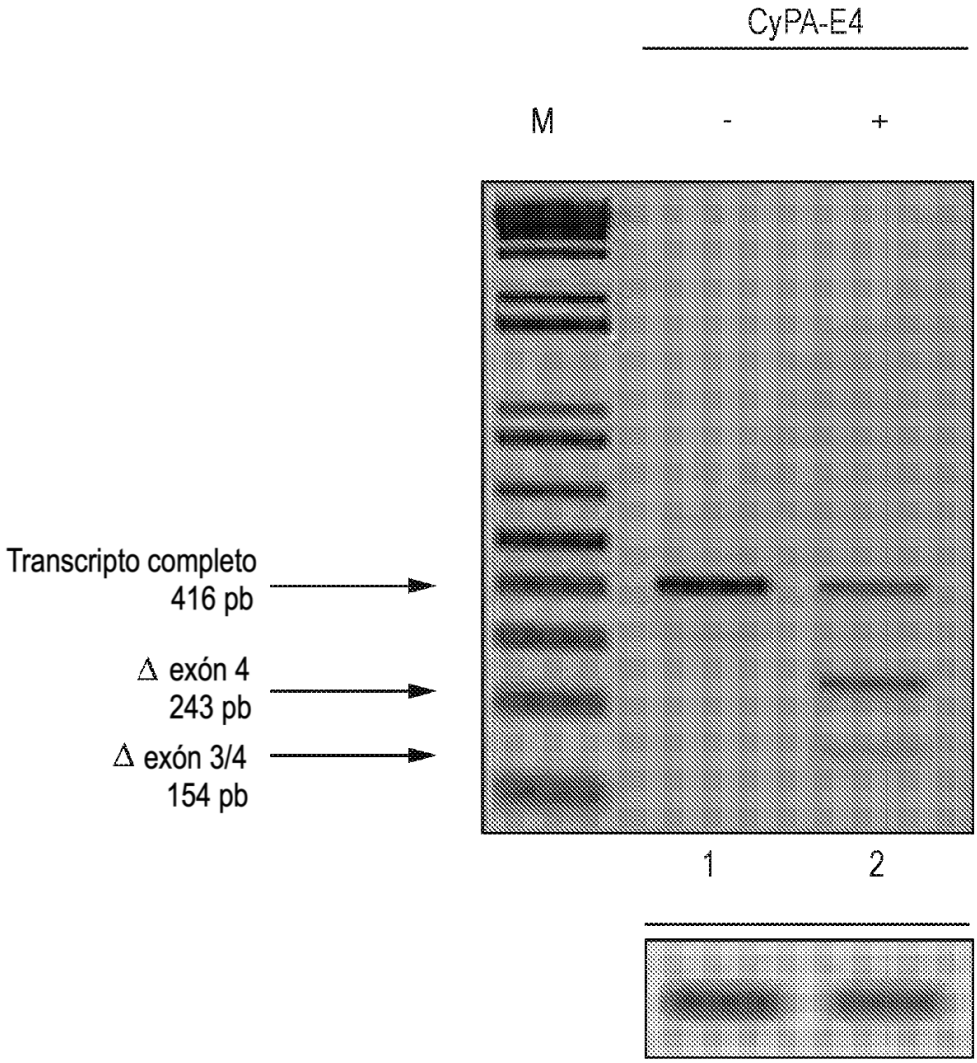

Antisentido nuevo
NsiI
ARNm de U7
Vector
SF_U7_ARNnp
SalI
SalI
lateral 3' de U7
Horquilla 3'
Sm OPT
Producto PCR que sobresale
Antisentido
Cebador inverso
NsiI
SalI
Antisentido
NsiI
Cebador directo
NsiI
ARNm de U7
Vector
SF_U7_ARNnp

Fig. 18


CyPA-E4
M
-
+
Transcripto completo
416 pb
Δ exón 4
243 pb
Δ exón 3/4
154 pb
1
2

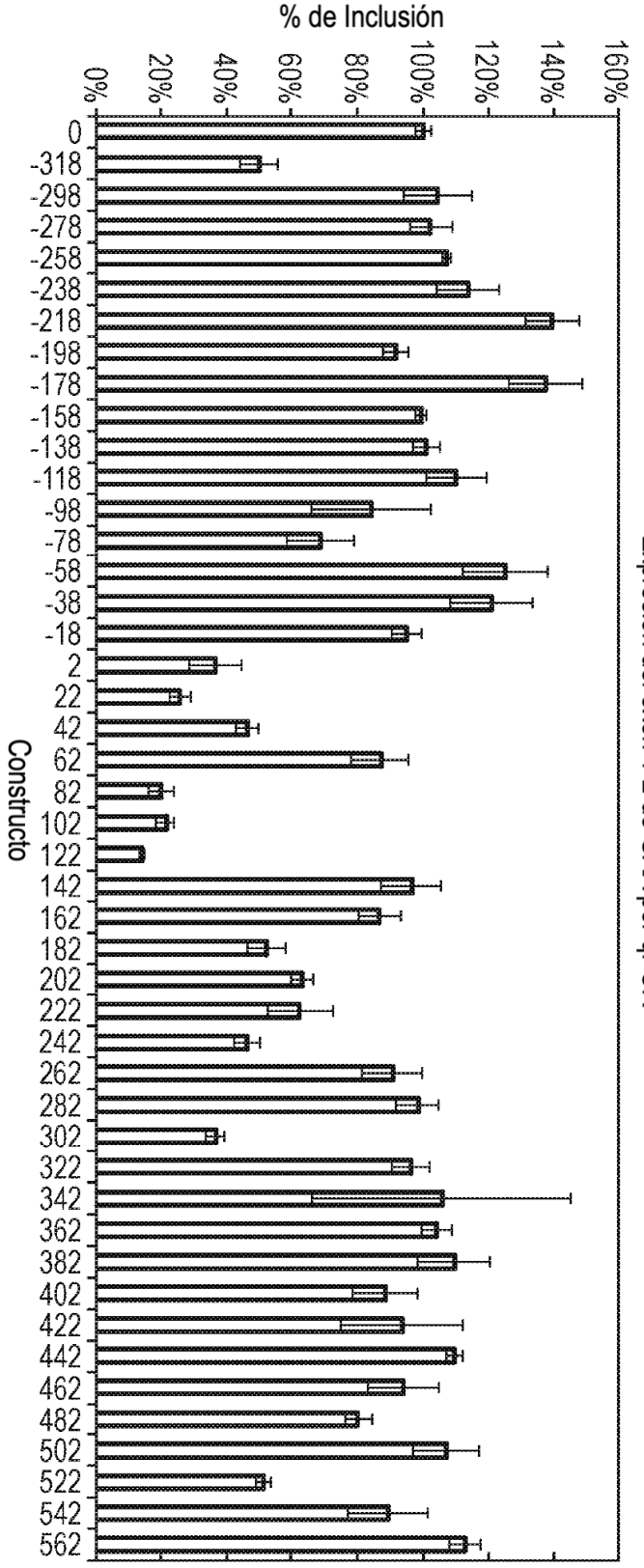
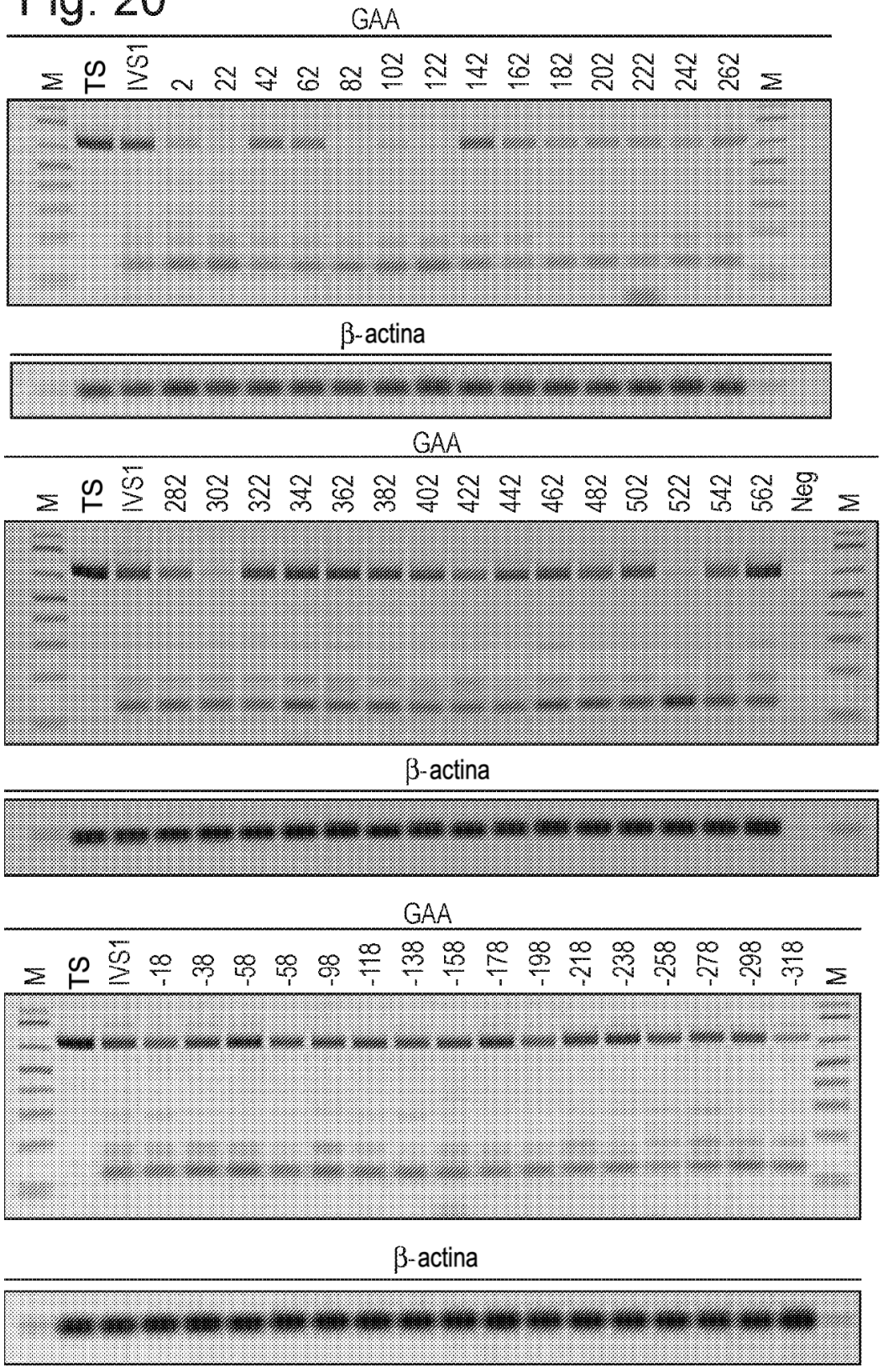

% de Inclusión
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
140%
160%
Constructo
0
-318
-298
-278
-258
-238
-218
-198
-178
-158
-138
-118
-98
-78
-58
-38
-18
2
22
42
62
82
102
122
142
162
182
202
222
242
262
282
302
322
342
362
382
402
422
442
462
482
502
522
542
562
Expresión del exón 1-2 de GAA por qPCR

Fig. 19

Fig. 20


GAA
M
TS
IVS1
2
22
42
62
82
102
122
142
162
182
202
222
242
262
M
β-actina
GAA
M
TS
IVS1
282
302
322
342
362
382
402
422
442
462
482
502
522
542
562
Neg
M
β-actina
GAA
M
TS
IVS1
-18
-38
-58
-58
-98
-118
-138
-158
-178
-198
-218
-238
-258
-278
-298
-318
M
β-actina

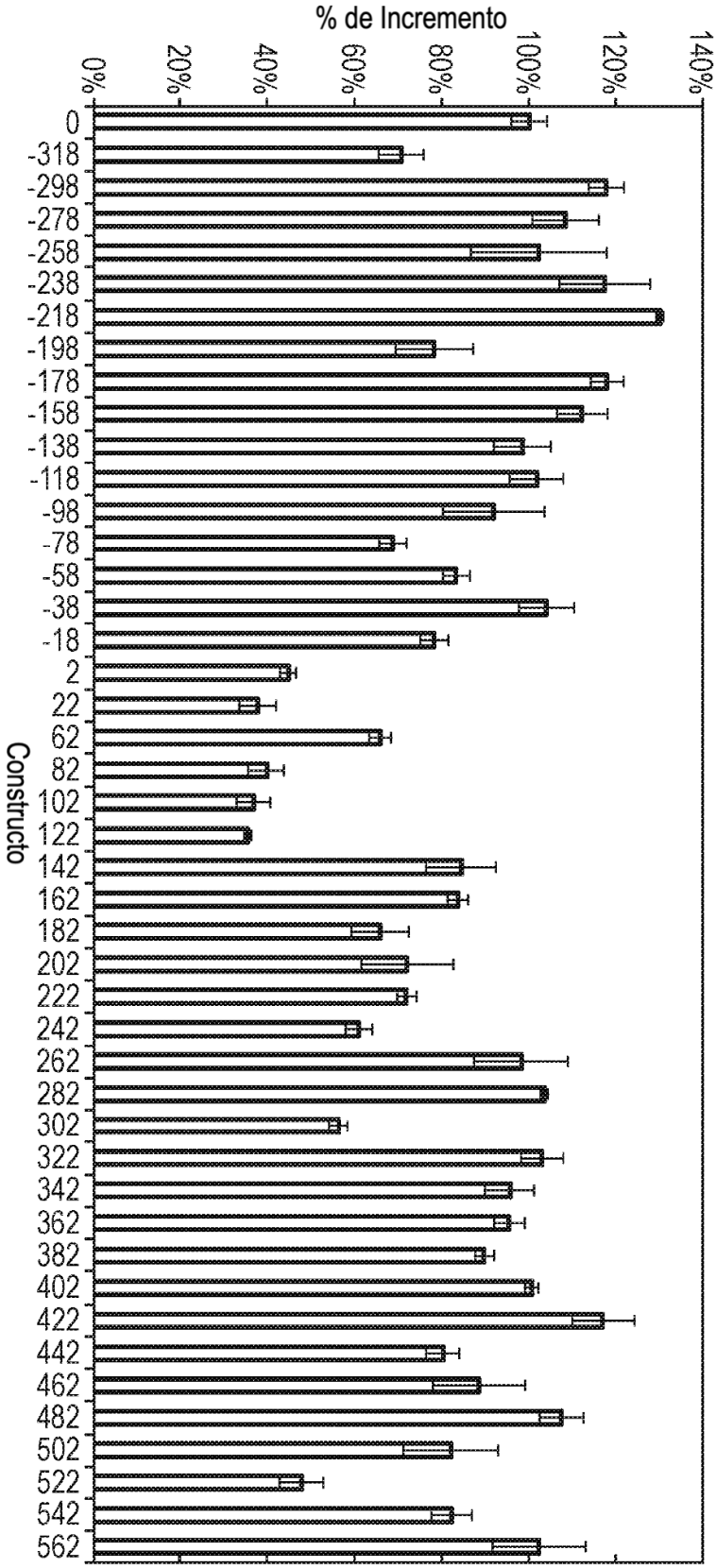

% de Incremento
0%
20%
40%
60%
80%
100%
120%
140%
Constructo
0
-318
-298
-278
-258
-238
-218
-198
-178
-158
-138
-118
-98
-78
-58
-38
-18
2
22
62
82
102
122
142
162
182
202
222
242
262
282
302
322
342
362
382
402
422
442
462
482
502
522
542
562
Actividad Enzimática de GAA

Fig. 21

Fig. 22

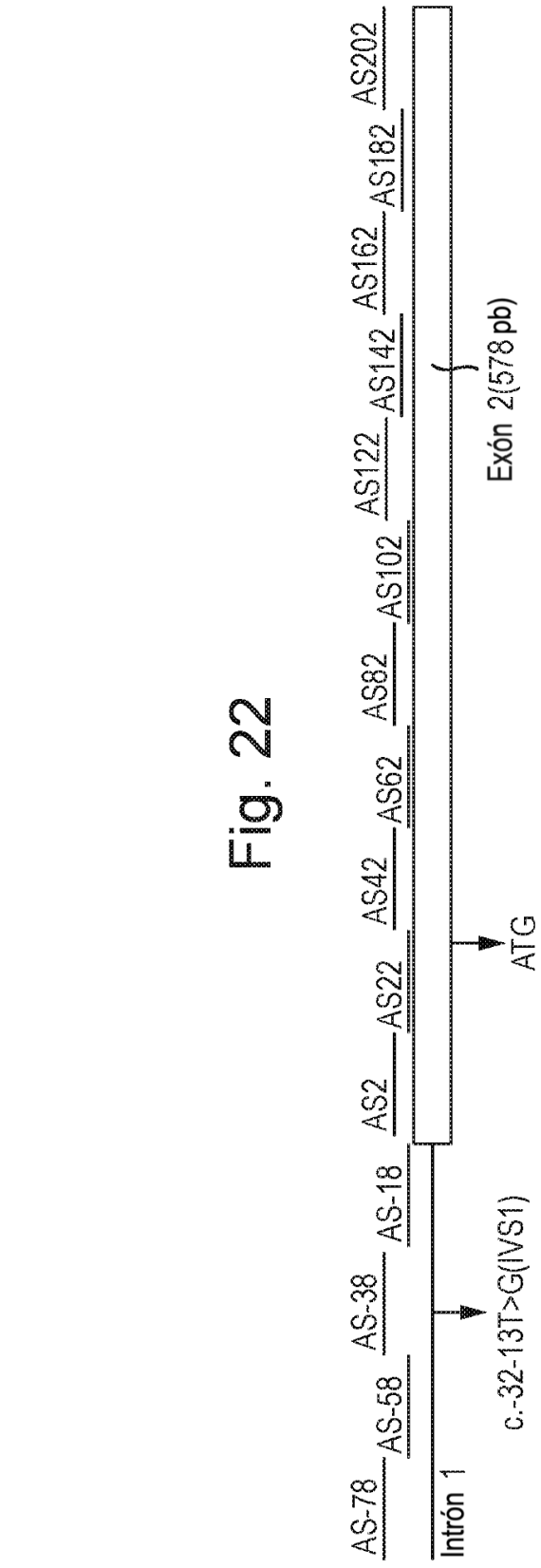

AS-78
AS-58
AS-38
AS-18
AS2
AS22
AS42
AS62
AS82
AS102
AS122
AS142
AS162
AS182
AS202
Intrón 1
c.-32-13T>G(IVS1)
ATG
Exón 2(578 pb)

Fig. 23

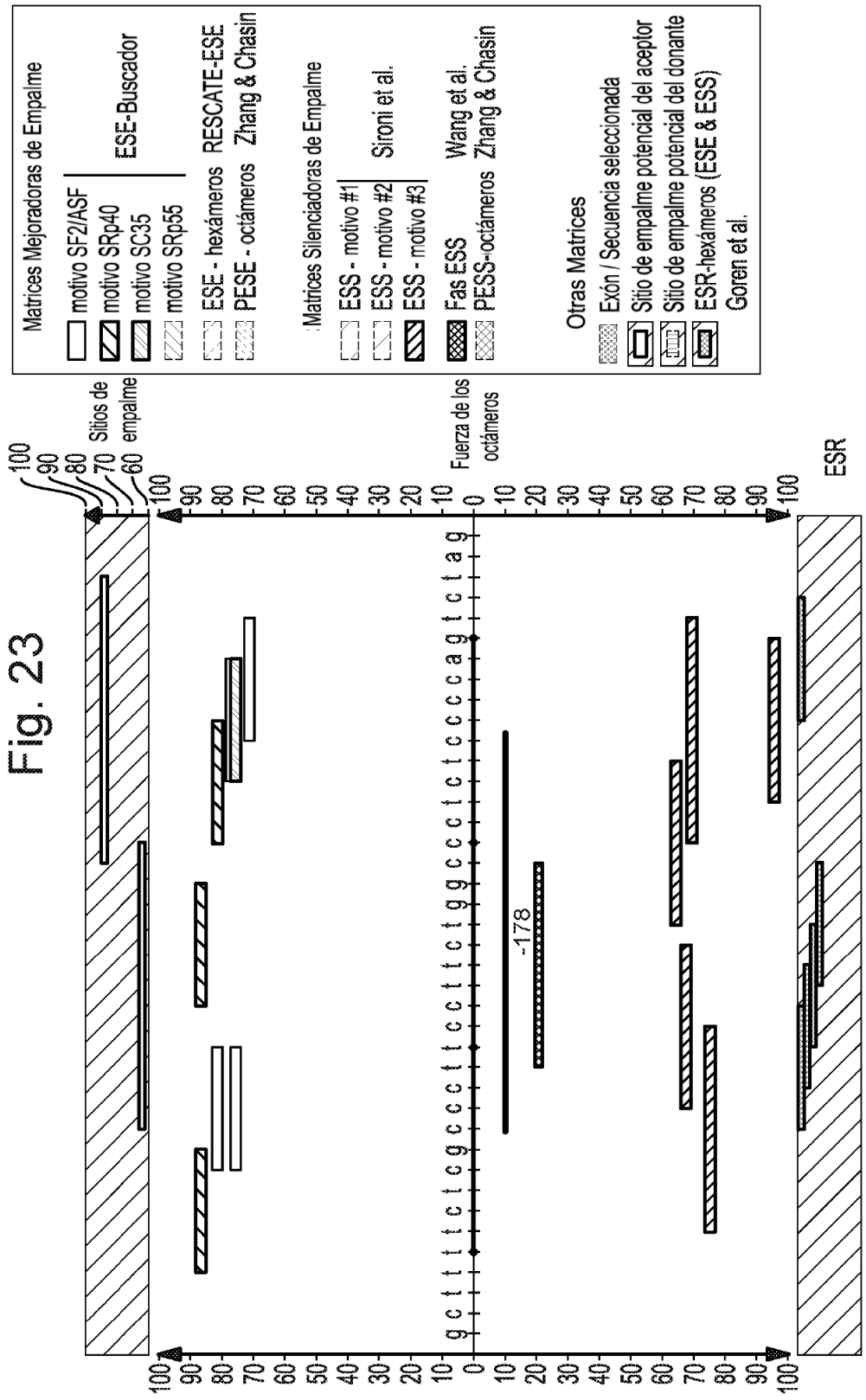

Matrices Mejoradoras de Empalme
motivo SF2/ASF
motivo SRp40
motivo SC35
motivo SRp55
ESE-Buscador
ESE - hexámeros
PESE - octámeros
RESCATE-ESE
Zhang & Chasin
Matrices Silenciadoras de Empalme
ESS - motivo #1
ESS - motivo #2
ESS - motivo #3
Sironi et al.
Fas ESS
PESS-octámeros
Wang et al.
Zhang & Chasin
Otras Matrices
Exón / Secuencia seleccionada
Sitio de empalme potencial del aceptor
Sitio de empalme potencial del donante
ESR-hexámeros (ESE & ESS)
Goren et al.
Sitios de empalme
Fuerza de los octámeros
ESR
-178

Fig. 24A

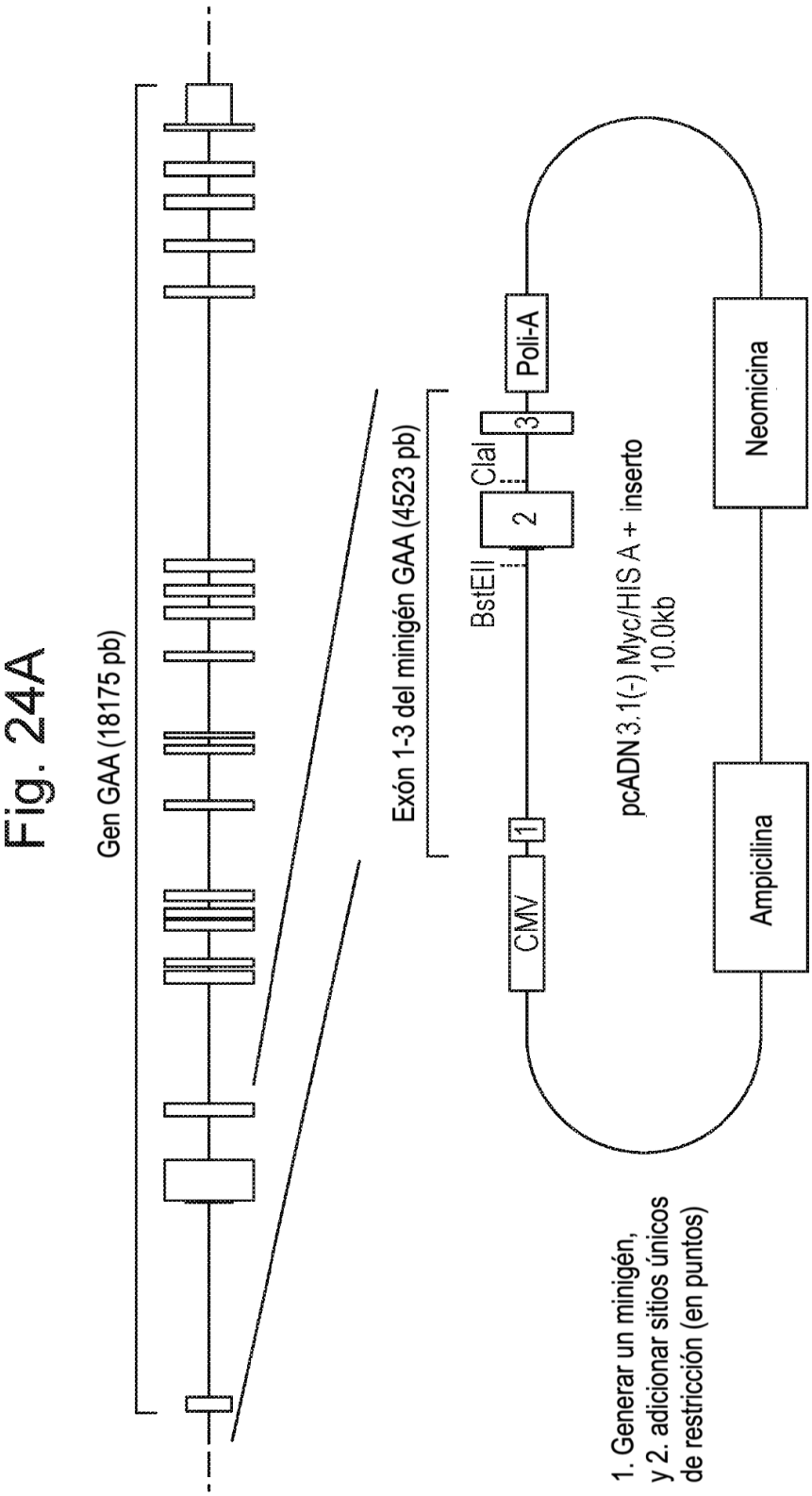
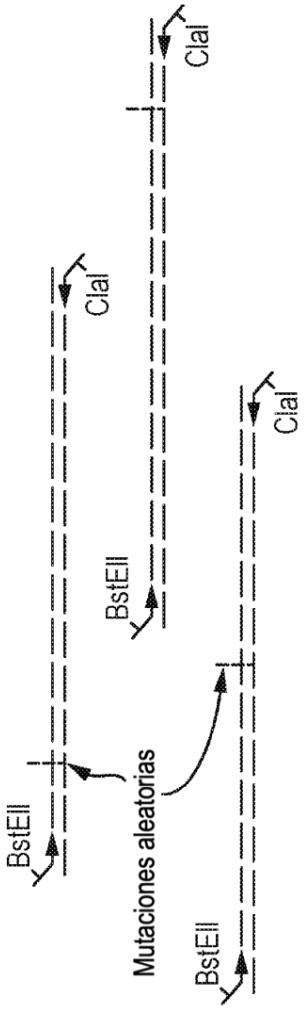
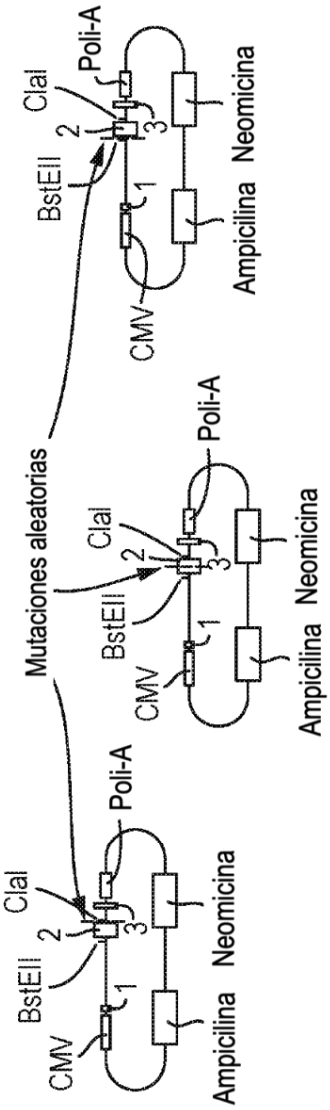

Gen GAA (18175 pb)
Exón 1-3 del minigén GAA (4523 pb)
BstEII
ClaI
CMV
1
2
3
Poli-A
pcADN 3.1(-) Myc/HIS A + inserto
10.0kb
Neomicina
Ampicilina
1. Generar un minigén,
y 2. adicionar sitios únicos
de restricción (en puntos)

Fig. 24B



3. Realizar PCR degenerada con el minigén como plantilla

Fig. 24C



4. Ligar los productos de PCR en el vector y generar clones

Fig. 24D

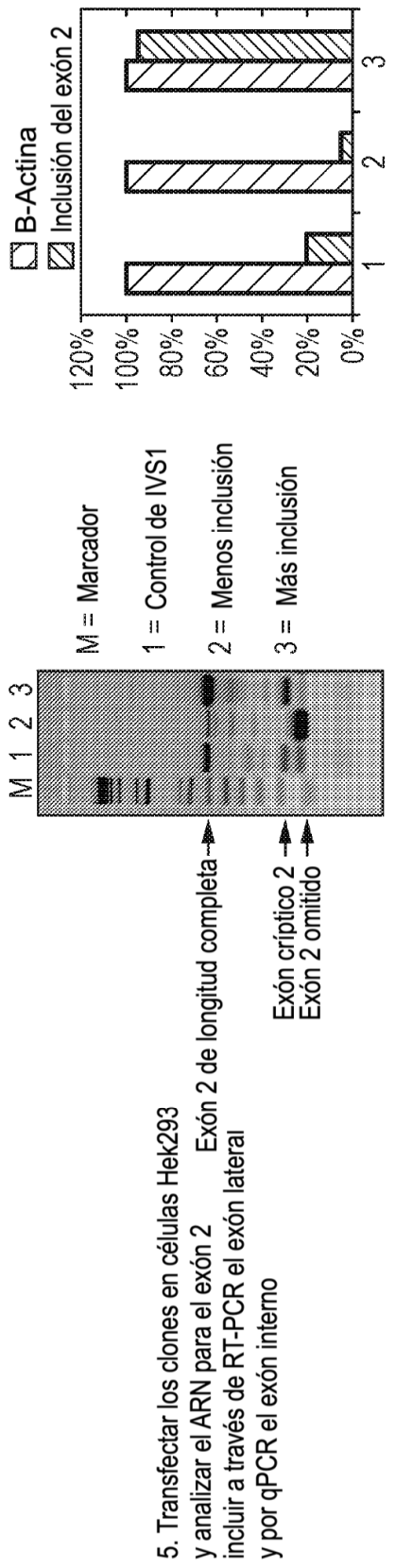


Fig. 24E

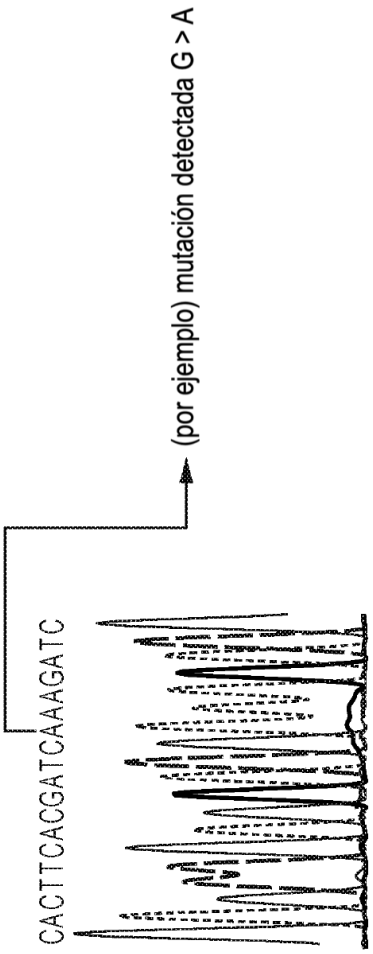


Fig. 25A

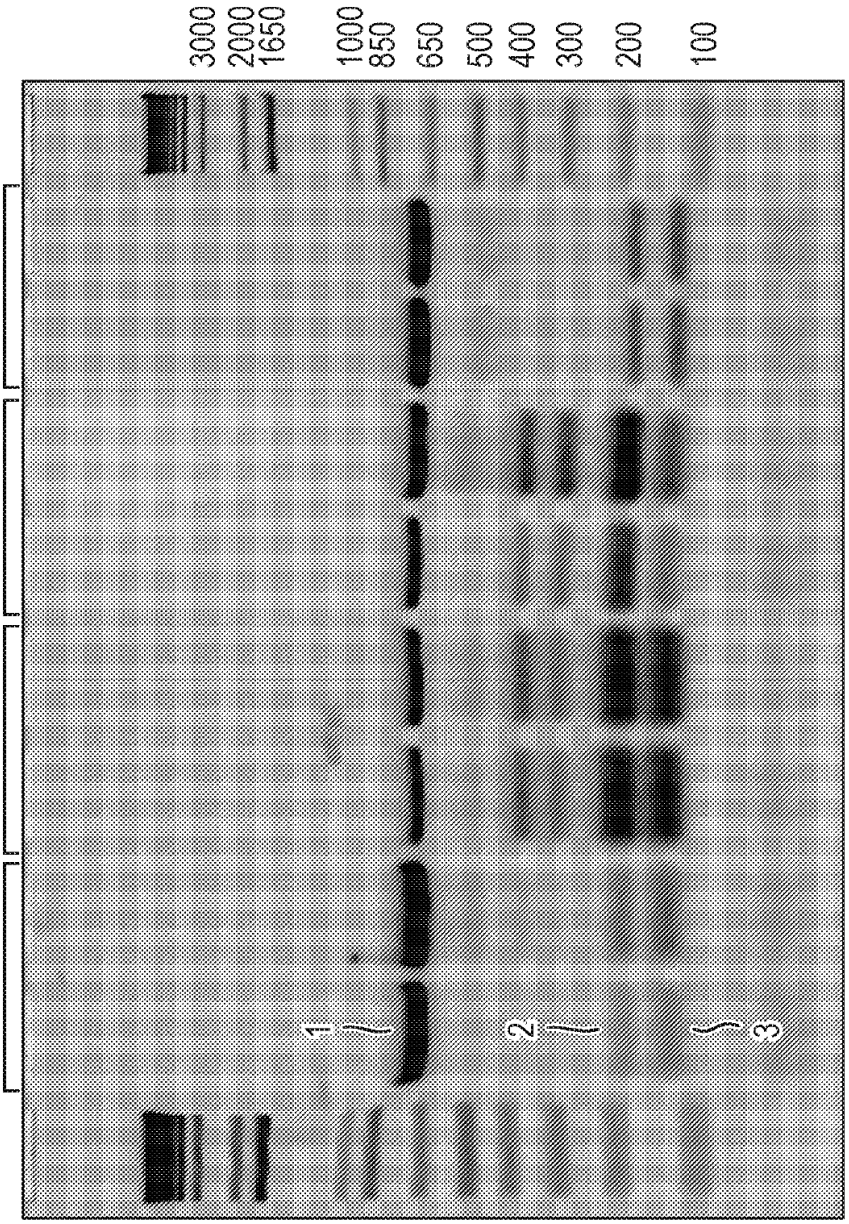

M
TS
IVS1
clon 115
clon 97
M
3000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100
1
2
3

Fig. 25B

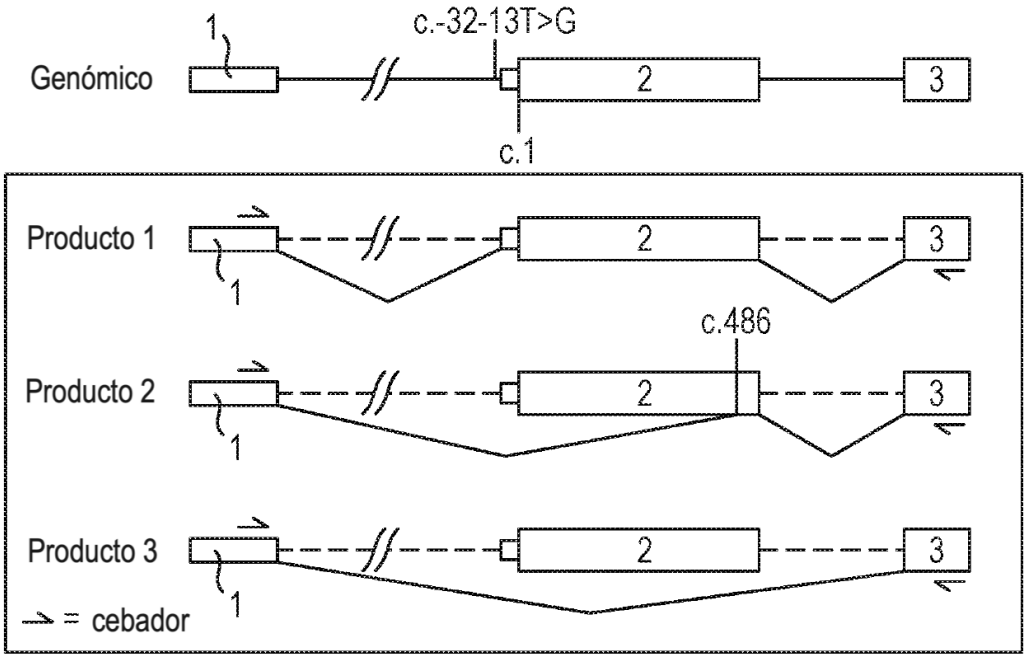


Fig. 25C

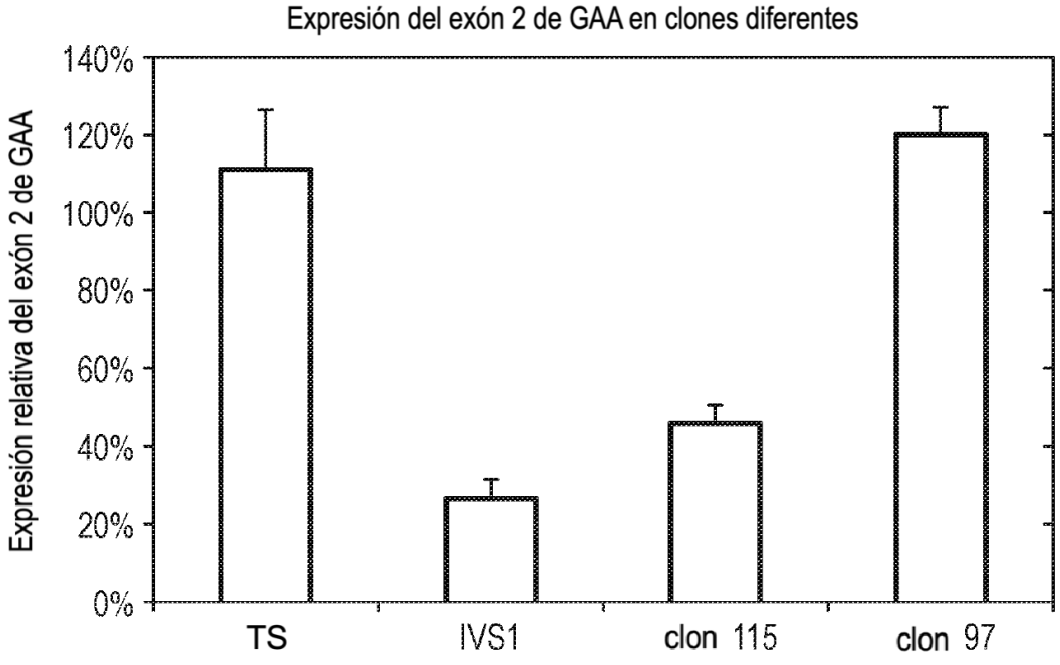


Figura 26:

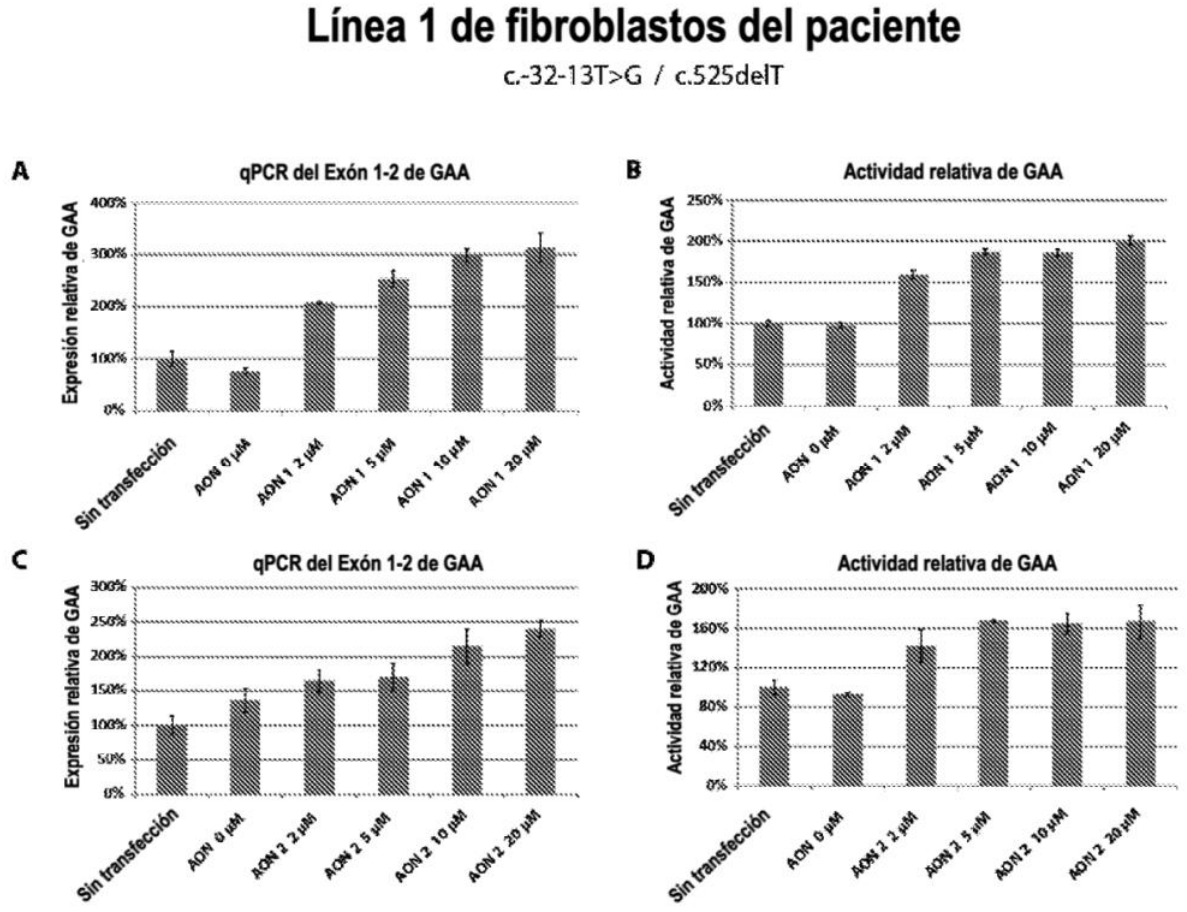

Línea 1 de fibroblastos del paciente
c.-32-13T>G / c.525delT
A
qPCR del Exón 1-2 de GAA
Expresión relativa de GAA
400%
300%
200%
100%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 1 2 µM
AON 1 5 µM
AON 1 10 µM
AON 1 20 µM
B
Actividad relativa de GAA
Actividad relativa de GAA
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 1 2 µM
AON 1 5 µM
AON 1 10 µM
AON 1 20 µM
C
qPCR del Exón 1-2 de GAA
Expresión relativa de GAA
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 2 2 µM
AON 2 5 µM
AON 2 10 µM
AON 2 20 µM
D
Actividad relativa de GAA
Actividad relativa de GAA
200%
160%
120%
80%
40%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 2 2 µM
AON 2 5 µM
AON 2 10 µM
AON 2 20 µM

Figura 27:

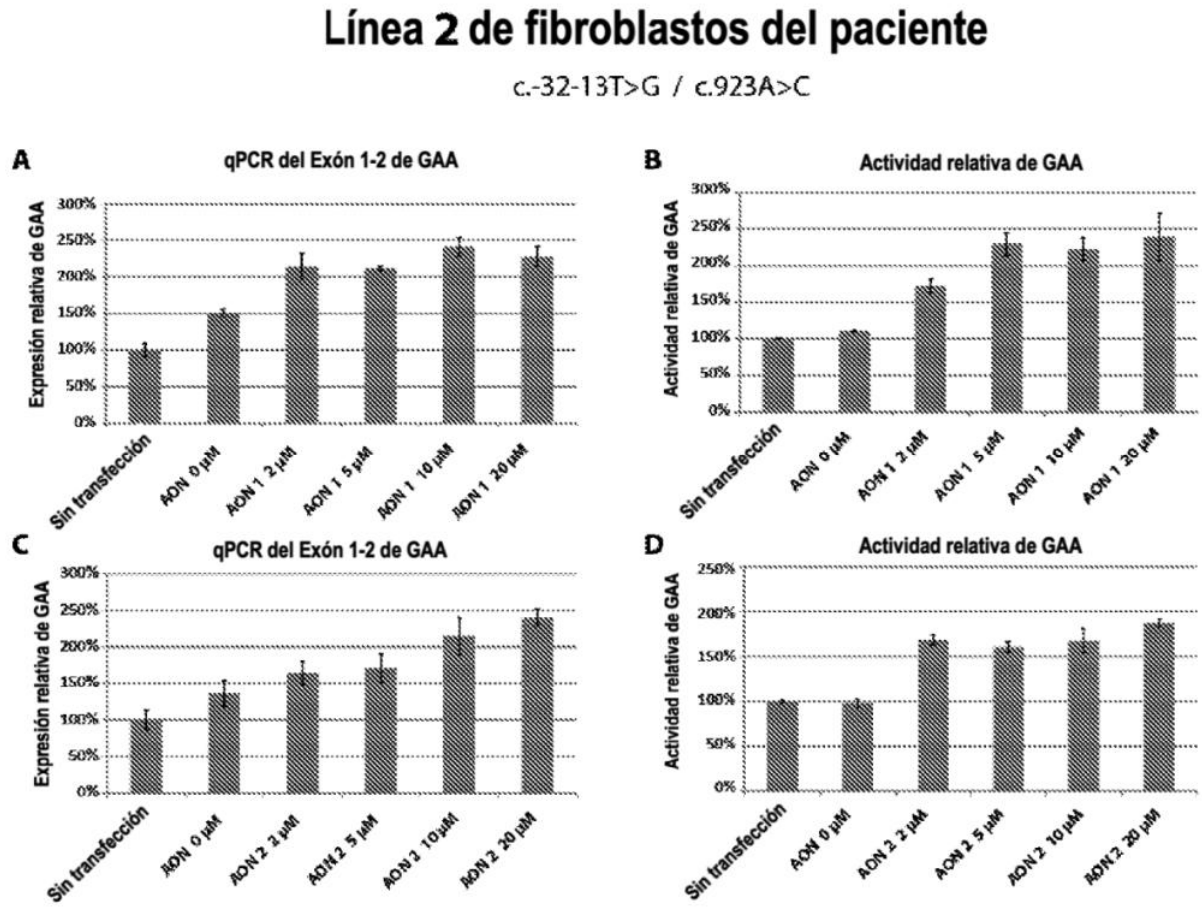

Línea 2 de fibroblastos del paciente
c.-32-13T>G / c.923A>C
A
qPCR del Exón 1-2 de GAA
Expresión relativa de GAA
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 1 2 µM
AON 1 5 µM
AON 1 10 µM
AON 1 20 µM
B
Actividad relativa de GAA
Actividad relativa de GAA
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 1 2 µM
AON 1 5 µM
AON 1 10 µM
AON 1 20 µM
C
qPCR del Exón 1-2 de GAA
Expresión relativa de GAA
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 2 2 µM
AON 2 5 µM
AON 2 10 µM
AON 2 20 µM
D
Actividad relativa de GAA
Actividad relativa de GAA
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
AON 2 2 µM
AON 2 5 µM
AON 2 10 µM
AON 2 20 µM

Figura 28:

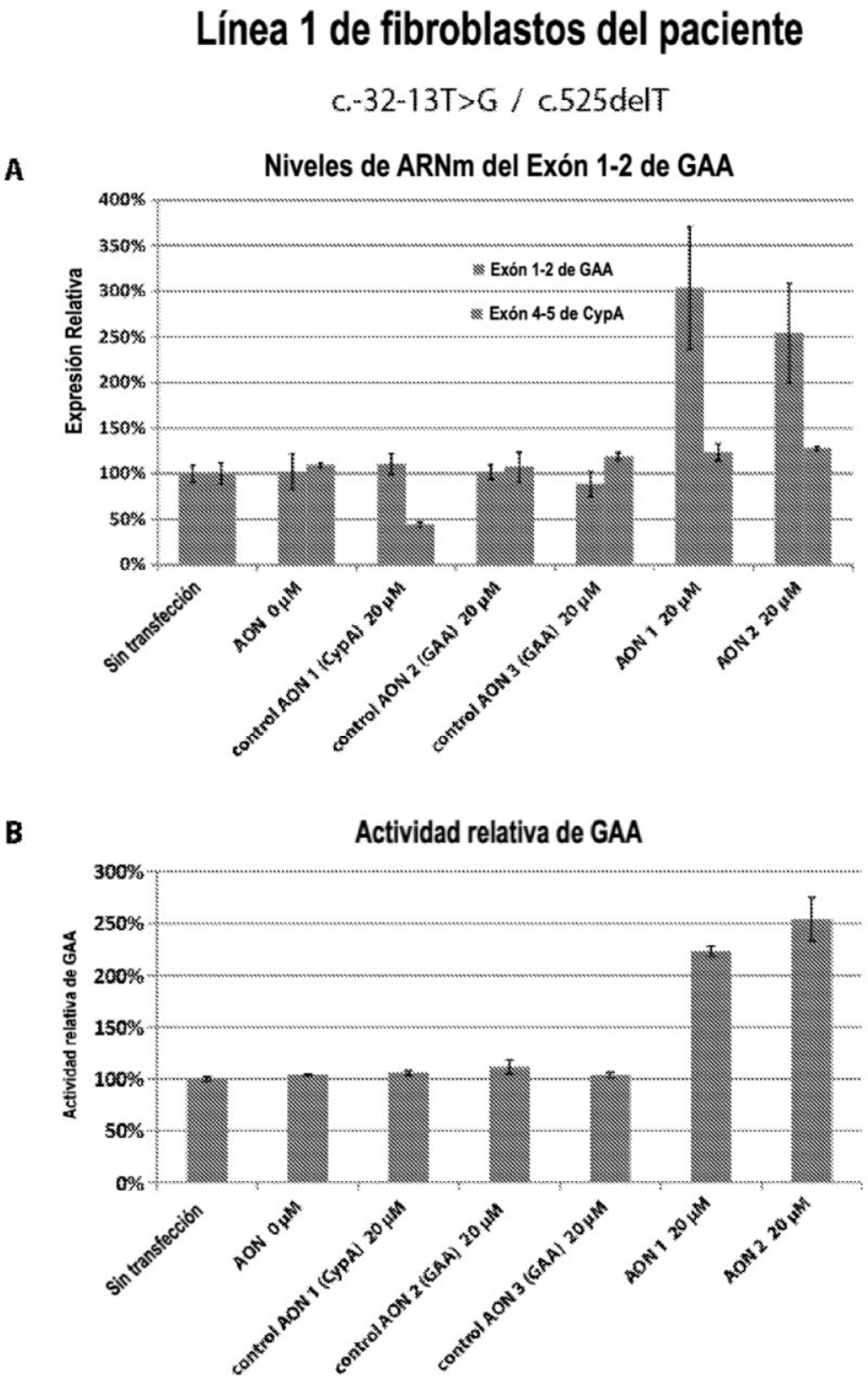

Línea 1 de fibroblastos del paciente
c.-32-13T>G / c.525delT
A
Niveles de ARNm del Exón 1-2 de GAA
Expresión Relativa
400%
350%
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Exón 1-2 de GAA
Exón 4-5 de CypA
Sin transfección
AON 0 µM
control AON 1 (CypA) 20 µM
control AON 2 (GAA) 20 µM
control AON 3 (GAA) 20 µM
AON 1 20 µM
AON 2 20 µM
B
Actividad relativa de GAA
Actividad relativa de GAA
300%
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Sin transfección
AON 0 µM
control AON 1 (CypA) 20 µM
control AON 2 (GAA) 20 µM
control AON 3 (GAA) 20 µM
AON 1 20 µM
AON 2 20 µM

Figura 32:

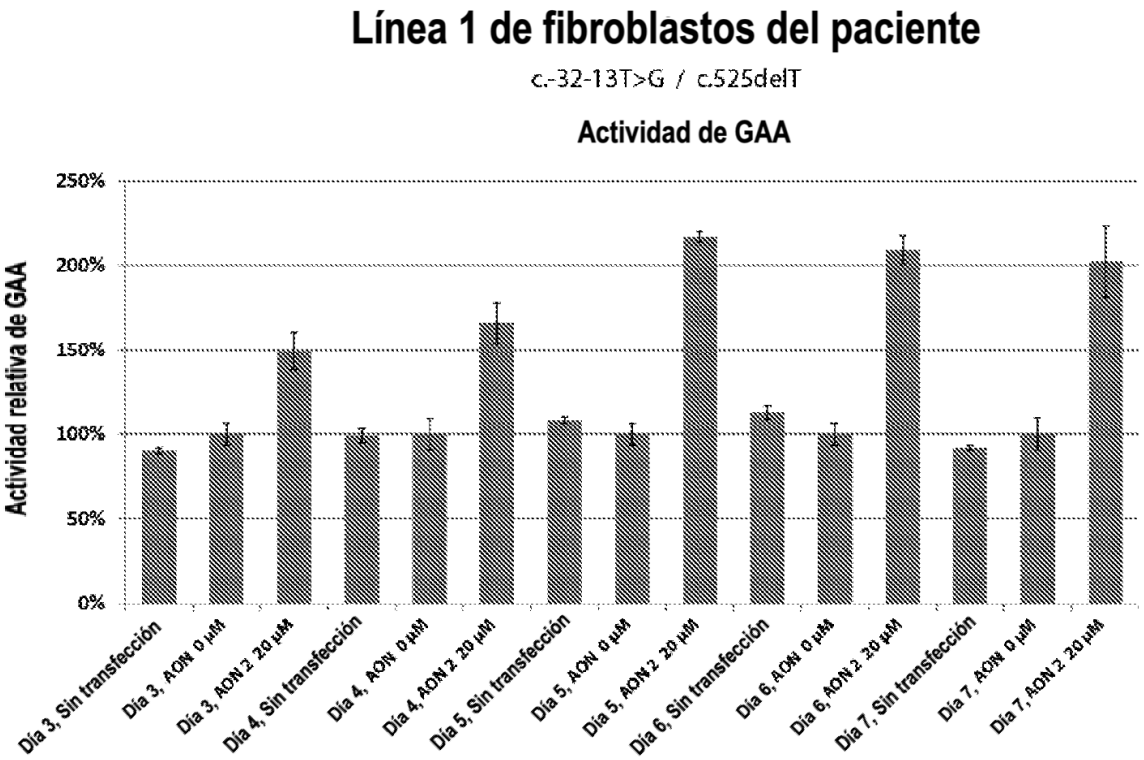
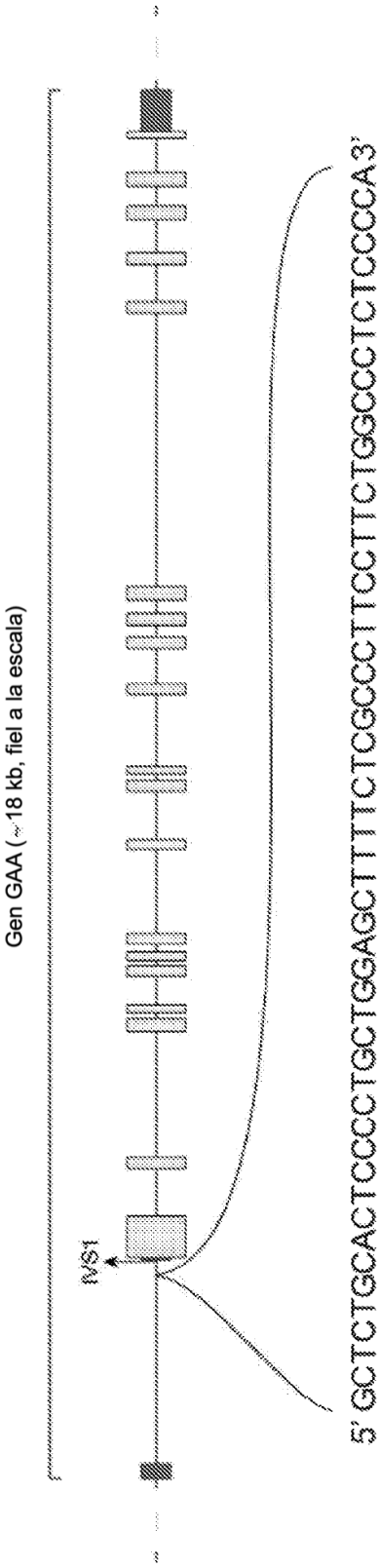

Línea 1 de fibroblastos del paciente
c.-32-13T>G / c.525delT
Actividad de GAA
Actividad relativa de GAA
250%
200%
150%
100%
50%
0%
Día 3, Sin transfección
Día 3, AON 0 µM
Día 3, AON 2 20 µM
Día 4, Sin transfección
Día 4, AON 0 µM
Día 4, AON 2 20 µM
Día 5, Sin transfección
Día 5, AON 0 µM
Día 5, AON 2 20 µM
Día 6, Sin transfección
Día 6, AON 0 µM
Día 6, AON 2 20 µM
Día 7, Sin transfección
Día 7, AON 0 µM
Día 7, AON 2 20 µM

Figura 33



La secuencia de referencia de ADNg está en Human, Dic. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly, chr17:80, 104, 345-80, 104,399

Figura 34

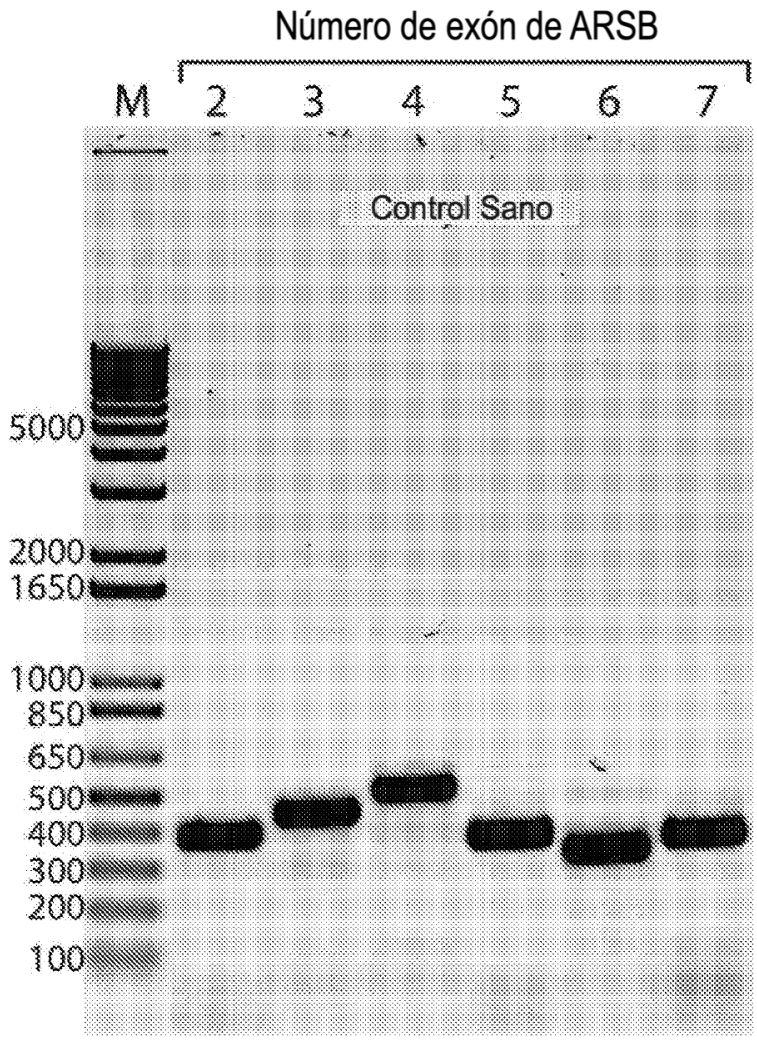

Número de exón de ARSB
M
2
3
4
5
6
7
Control Sano
5000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Figura 35

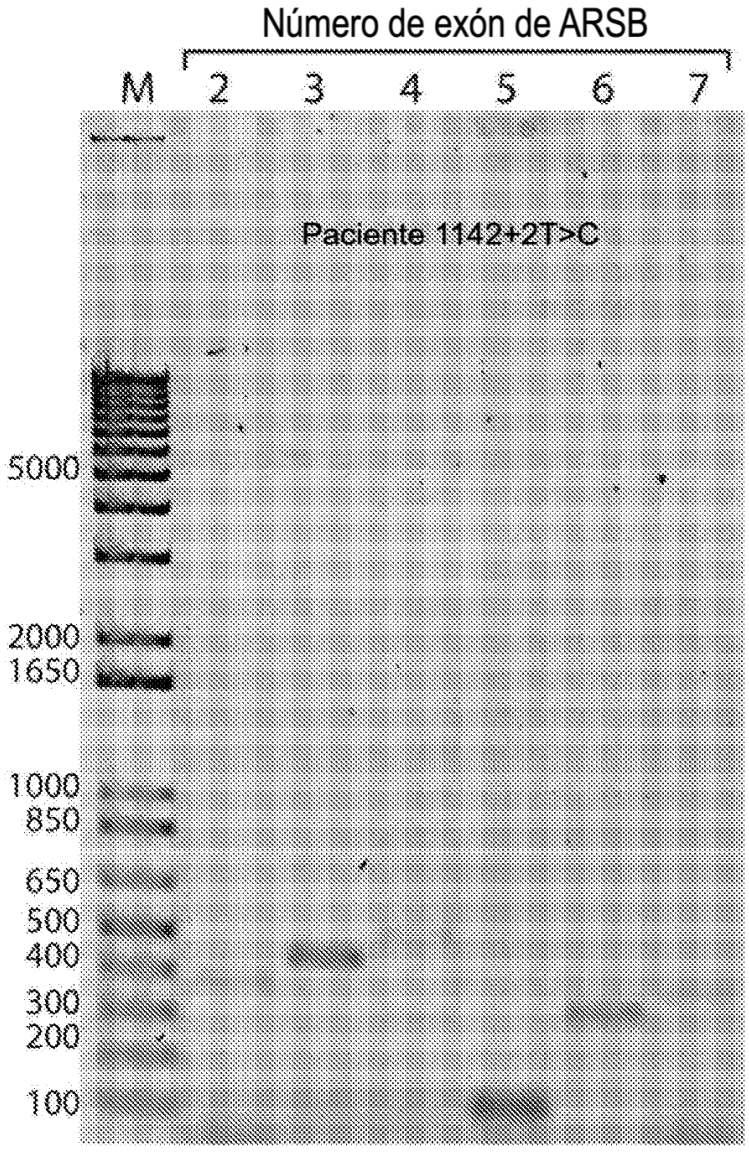

Número de exón de ARSB
M
2
3
4
5
6
7
Paciente 1142+2T>C
5000
2000
1650
1000
850
650
500
400
300
200
100

Fig. 36

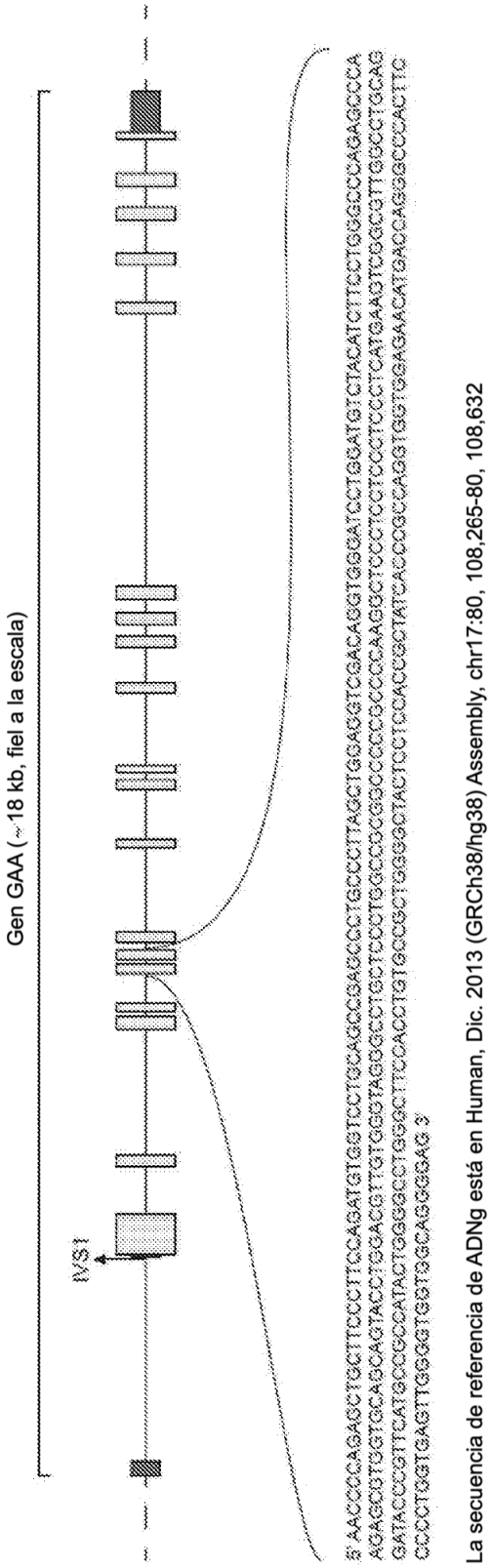
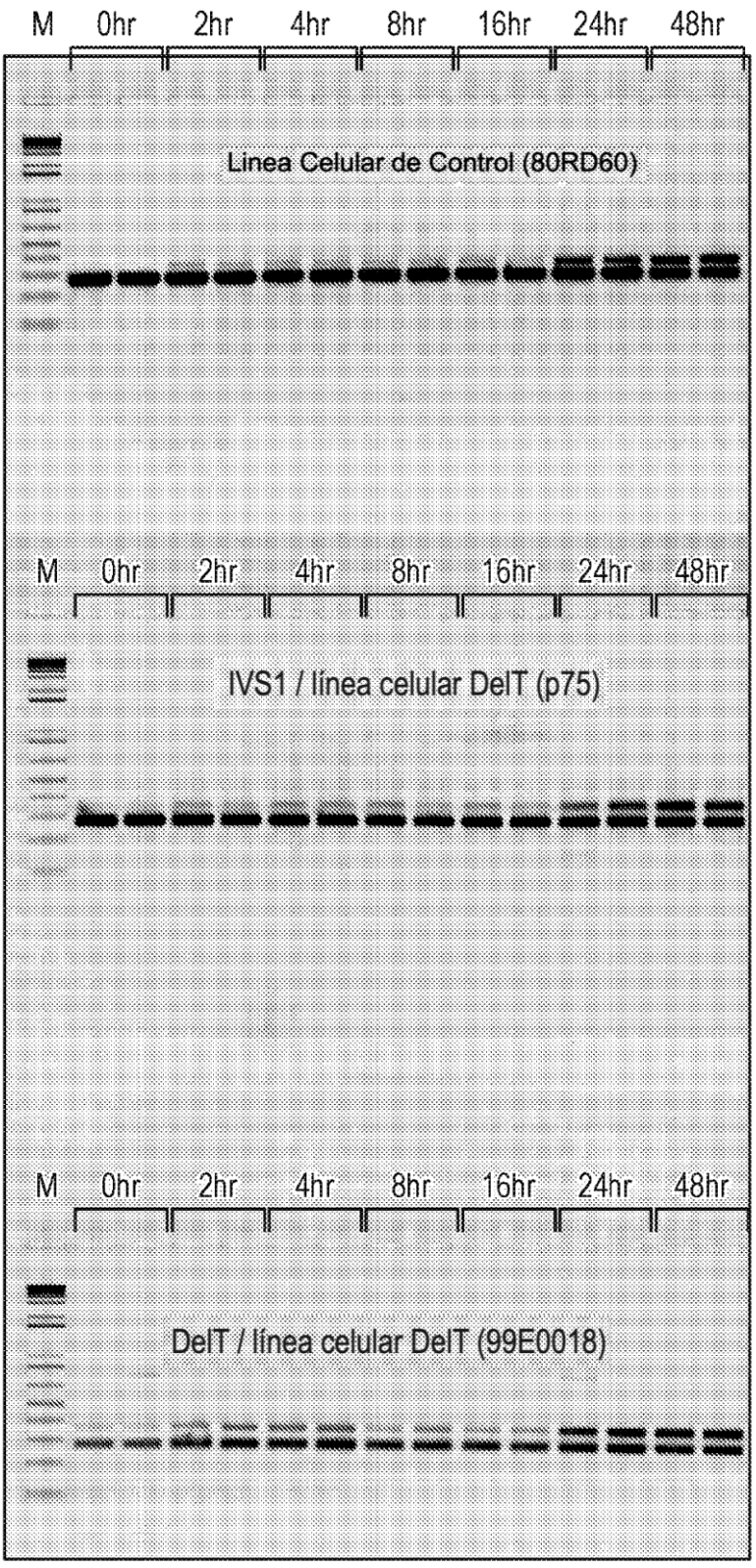

Gen GAA (~18 kb, fiel a la escala)
IVS1
5' AACCCCAGAGCTGCTTCCCTTCCAGATGTGGTCCTGCAGCCGATGCCCTGCCCTTAGCTGGAGGTCGACAGGTGGGATCCTGGATGTCTACATCTTCCTGGGCCCAGAGCCCA
AGAGCGTGGTGCAGCAGTACCTGGACGTTGTGGGTAGGGCCTGCTGCTCCCTGGCCGCGCCCCCCGCCCCCAAGGCTCCCTCCTCCCTCCTCATGAAGTCGGCGTTGGCCTGCAG
GATACCCGTTCATGCCCCCATACTGGGGCCTGGGCTTCCACCTGTGCCGCTGGGGCTACTCCTCCACCCGCCAGGTGGTGGAGAACATGACCAGGGCCCACTTC
CCCCTGGTGAGTTGGGGGTGGTGGTGCAGGGGAG 3'
La secuencia de referencia de ADNg está en Human, Dic. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly, chr17:80, 108,265-80, 108,632

Fig. 36


M
0hr
2hr
4hr
8hr
16hr
24hr
48hr
Linea Celular de Control (80RD60)
M
0hr
2hr
4hr
8hr
16hr
24hr
48hr
IVS1 / línea celular DelT (p75)
M
0hr
2hr
4hr
8hr
16hr
24hr
48hr
DelT / línea celular DelT (99E0018)